

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE E2M2

« Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation »

DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité : Microbiologie moléculaire et biochimie

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le **3 juin 2014**

par

Mlle Guschinskaya Natalia

TITRE

Caractérisation moléculaire des signaux de sécrétion des protéines sécrétées par le système de sécrétion de type II de la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii*.

Directeur de thèse : Dr. Vladimir Shevchik

JURY

Mme Olivera FRANCETIC DR (Institut Pasteur)	Rapporteur
M Romé VOULHOUX DR CNRS (Université Aix-Marseille)	Rapporteur
Mme Ewa LOJKOWSKA Professeur (University of Gdansk)	Rapporteur
M Eric FAUDRY CR (CEA Grenoble)	Examineur
M Christophe GRANGEASSE DR (IBCP, Lyon)	Examineur
M Christophe BRUEL Professeur (Univ. Claude Bernard, Lyon)	Examineur
M Vladimir SHEVCHIK DR (CNRS, Lyon)	Directeur de thèse

Remerciements.

Je voudrais commencer par remercier Monsieur Romé Voulhoux, Madame Olivera Francetic et Madame Ewa Lojkowska d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie également Monsieur Christophe Grangeasse, Monsieur Christophe Bruel et Monsieur Eric Faudry d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Je remercie Madame Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat pour m'avoir accueilli dans le laboratoire de Microbiologie, Adaptation et Pathogénie.

Je tiens à remercier infiniment mon directeur de thèse, Monsieur Vladimir Shevchik, de m'avoir donné la possibilité de vivre cette expérience très riche. Je le remercie pour son accueil et son encadrement tout au long de ces années. Je le remercie aussi pour tout le temps qu'il a passé à me former personnellement, autant d'un point de vue théorique que pratique. Merci beaucoup pour votre confiance et pour m'avoir transmis votre passion pour la science.

Je voudrais aussi remercier Monsieur Guy Condemine pour sa bonne humeur, sa disponibilité, ses conseils et son aide précieuse pendant la période de la rédaction.

Je remercie nos collaborateurs Monsieur Lionel Ballut, Monsieur Patrice Gouet, Monsieur Xavier Robert de l'IBCP de Lyon, Mr Richard W Pickersgill et Shuang Gu de Queen Mary University of London.

Je remercie l'ensemble du personnel technique pour le support précieux fourni mais également pour leur bonne humeur et leurs conversations : Véronique Utzinger, Yvette Alfaro, et Jean-Michel Prost. Je tiens à remercier le personnel administratif pour leurs conseils, leur bonne humeur et leur patience.

J'adresse aussi mes remerciements aux membres actuels et passés du laboratoire MAP, pour leur soutien et leurs conseils scientifiques.

Je voudrais maintenant remercier tous les étudiants passés et présents. Je pense notamment à Xiaohui Wang et Arnaud Rondelet. Je remercie également Quaffa, Sana, Susan, Servane, Mélanie, Lou, Sacha et puis les autres.

Je veux remercier de tous mon cœur mes amies Malgorzata Golanowska, Elodie Hérault et Camille Pineau. Merci pour votre support moral, votre écoute et votre présence à mes côtés. Votre amitié que je garderais toujours était le soutien le plus précieux pendant ces années. Gosia, Elodie, Camille, je suis très heureuse de vous avoir connues.

Je tiens à remercier ma famille, ma mère, mon père, ma grande mère et ma sœur. Malgré les distances qui nous séparent, vous avez pu me faire sentir que vous étiez toujours proches. Votre soutien et vos encouragements m'étaient indispensable pour venir à bout de cette aventure.

Enfin, je dois mentionner la grande patience et la compréhension d'Ayham Alata. Il a su me soutenir dans les moments les plus durs et me redonner le moral lors de mes déceptions professionnelles. Merci Ayham, ta présence à mes côtés a été essentielle pour compléter ce travail.

Sommaire.

REMERCIEMENTS.....	3
SOMMAIRE.....	5
LISTE DES FIGURES.....	8
ABRÉVIATIONS.....	12
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
INTRODUCTION GENERALE.....	14
EXPORTATION DES PROTEINES.....	16
I. Le système Sec.....	16
I.1. Introduction.....	16
I.2. La séquence signal Sec et le fonctionnement du système Sec.....	17
I.3. Les composants du système Sec.....	18
I.3.1 Le complexe SecYEG.....	18
I.3.2 Le chaperon SecB.....	20
I.3.3 La protéine motrice SecA.....	21
I.3.4 Le complexe SecDFYidC (YajC).....	24
I.4 Le mécanisme de translocation par le système Sec.....	25
II. Le système Tat.....	26
II.1. Introduction.....	26
II.2. L'importance du système Tat.....	26
II.3. Les substrats du système Tat et la séquence signal Tat.....	27
II.4. Le mécanisme de translocation par le système Tat.....	28
LES SYSTEMES DE SECRETION CHEZ LES BACTERIES A GRAM NEGATIF.....	31
III. Le système de sécrétion de type I (T1SS).....	32
III.1. Introduction.....	32
III.2. Le transporteur ABC joue le rôle principal dans le T1SS.....	33
III.2.1. Les transporteurs ABC possédant les domaines de type peptidase C39.....	34
III.2.2. T1SS avec les transporteurs ABC possédant un domaine CLD.....	35
III.2.3. T1SS avec les transporteurs ABC sans aucun domaine supplémentaire.....	36
IV. Le système de sécrétion de type III (T3SS).....	39
IV.1. Introduction.....	39
IV.2. Le rôle de chaperons dans la sécrétion par le T3SS.....	41
IV.2.1. Les chaperons de Classe I : les protecteurs de substrats de T3SS.....	41
IV.2.2. Les chaperons de Classe II.....	43
IV.2.3. Les chaperons de classe III.....	44
IV.3. Les effecteurs sécrétés par le T3SS.....	44
IV.4. Le signal de sécrétion de T3SS.....	45
IV.5. Le modèle de reconnaissance de substrats par le T3SS.....	46
V. Le système de sécrétion de type IV (T4SS).....	47
V.1. Introduction.....	47
V.2. Les composants essentiels de T4SS chez les bactéries à Gram négatif.....	48

V.2.1. Les ATPases.....	49
V.2.2. Le complexe de base de T4SS.	50
V.2.3. Les composants de T4SS situés dans la membrane interne : VirB3, VirB6, VirB8.....	51
V.2.4. Le pilus.	52
V.3. La comparaison entre T4SS chez les bactéries à Gram négatif et Gram positif.	52
V.4. Le mécanisme de reconnaissance de substrat par le T4SS.	54
VI. Le système de sécrétion de type V (T5SS).	56
VI.1. Introduction.	56
VI.2. T5aSS, les autotransporteurs monomériques.	58
VI.3. Biogenèse des autotransporteurs monomériques.....	59
VI.4. T5bSS, le système à deux partenaires.	61
VII. Le système de sécrétion de type VI (T6SS).	63
VII.1. Introduction.	63
VII.2. Cycle de fonctionnement du T6SS.	65
VII.3. Les effecteurs sécrétés par T6SS.....	66
VIII. LE SYSTEME DE SECRETION DE TYPE II (T2SS).	67
VIII.1. Introduction.	67
VIII.2. Répartition des T2SSs chez les bactéries à Gram négatif.	68
VIII.3. Le système T2SS, l'organisation de l'opéron.	68
VIII.4. La localisation et l'assemblage de T2SS.....	69
VIII.4. Les composants du T2SS.	70
VIII.4.1. La sécrétine GspD.....	70
VIII.4.2. GspS, la pilotine.	78
VIII.4.3. La protéine GspC.....	81
VIII.4.3.1. Description générale.....	82
VIII.4.3.2. Le domaine PDZ.	83
VIII.4.3.3. Le domaine HR.....	86
VIII.4.4. Le pseudopilus.	89
VIII.4.4.1 Les pseudopilines et la prépiline peptidase.	89
VIII.4.4.2. Multimérisation de PulG et assemblage du pilus.....	93
VIII.4.4.3. Interactions entre les pseudopilines.....	95
VIII.4.4.4 Mécanisme de fonctionnement du pseudopilus.	97
VIII.4.5. L'ATPase GspE : le fournisseur d'énergie de T2SS.....	100
VIII.4.5.1. Description générale.....	100
VIII.4.5.2. Multimérisation de GspE.	102
VIII.4.6. La protéine GspF.	104
VIII.4.7. La protéine GspL.	106
VIII.4.7.1. Description générale.....	106
VIII.4.7.2. Le domaine cytoplasmique de GspL.	107
VIII.4.7.3. Le domaine périplasmique de GspL.....	108
VIII.4.8. La protéine GspM.....	109
VIII.4.9. Les interactions entre les protéines de la membrane interne.	110
VIII.5. Les protéines sécrétées par le T2SS.	112
VIII.5.1. Spécificité de sécrétion par le T2SS.....	112
VIII.5.2. Quel est le motif de la sécrétion ?	116
L'OBJECTIF DE L'ETUDE.	119
MATERIEL ET METHODES.	120

SOUCHES BACTERIENNES, PLASMIDES ET CONDITIONS DE CULTURE.	120
METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.	120
PONTAGE DIRIGE <i>IN VIVO</i>	121
ANALYSE DES PROTEINES.	121
FRACTIONNEMENT CELLULAIRE.	123
IMMUNOPRECIPITATION.	123
RESULTATS.	125
I. PONTAGE DIRIGE <i>IN VIVO</i>	125
II. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE PONTAGE DIRIGE <i>IN VIVO</i>	126
II.1. Mise au point de la technique de pontage dirigé <i>in vivo</i> chez <i>E. coli</i>	126
II.2. Mise au point de la technique de pontage dirigé <i>in vivo</i> chez <i>D. dadantii</i>	130
III. PONTAGE DIRIGE <i>IN VIVO</i> EN UTILISANT LA PROTEINE SECRETEE PELL.	133
III.1. Pontage dirigé <i>in vivo</i> en utilisant le domaine Fn3 de Pell.	134
III.1.1. Pontage dirigé <i>in vivo</i> de la boucle 3 du domaine Fn3.	136
III.1.1.a. Pontage dirigé <i>in vivo</i> chez <i>E. coli</i>	137
III.1.1.b. Pontage dirigé <i>in vivo</i> chez <i>D. dadantii</i>	138
III.1.1.c. Rôle du domaine PDZ d'OutC dans l'interaction avec la boucle 3 du domaine Fn3 de Pell.	141
III.1.1.d. Analyse de complexes par spectrométrie de masse.	144
III.1.2. Pontage dirigé <i>in vivo</i> des autres régions non-structurées de Pell.	151
III.1.3. Pontage dirigé <i>in vivo</i> de brins- β du domaine Fn3 de Pell.	153
III.2. Pontage dirigé <i>in vivo</i> du linker entre les deux domaines de Pell.	155
III.3. Pontage dirigé du domaine catalytique.	159
IV. PONTAGE DIRIGE <i>IN VIVO</i> DE LA PROTEINE OUTC.	166
IV.1. Pontage dirigé <i>in vivo</i> du domaine PDZ.	166
IV.2. Pontage dirigé <i>in vivo</i> du domaine HR d'OutC.	173
IV.2.1. Pontage dirigé <i>in vivo</i> du linker entre les deux feuillets β du domaine HR d'OutC.	173
IV.2.2. Pontage dirigé <i>in vivo</i> de brins- β du domaine HR d'OutC.	180
DISCUSSION.	187
ANNEXE I.	195
ANNEXE II.	203
ANNEXE III.	303
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.	309
SUMMARY	336

Liste des figures.

Section « Introduction bibliographique ».

Figure 1. Composition de l'enveloppe bactérienne.....	14
Figure 2. Voie générale d'exportation par le système Sec.	16
Figure 3. Présentation schématique d'un peptide signal N-terminal des substrats du système Sec.	17
Figure 4. Topologie de protéines SecY, SecE et SecG (Veenendaal <i>et al.</i> , 2004).	18
Figure 5. Structure cristalline de différents complexes SecYE(G/β).	19
Figure 6. Structure de SecB.	20
Figure 7. Modèle d'exportation post-traductionnelle.	21
Figure 8. Représentation de la protéine SecA.	22
Figure 9. Différentes structures du dimère SecA.....	23
Figure 10. Deux formes structurales et fonctionnelles de SecA.	23
Figure 11. Structure et mécanisme de fonctionnement du complexe SecDF.....	24
Figure 12. Etapes d'exportation par le système Sec.....	25
(Voir les explications dans le texte).....	25
Figure 13. Comparaison des séquences signal Tat et Sec.....	28
Figure 14. Modèle de translocation par le système Tat chez <i>E. coli</i> et dans les chloroplastes.....	30
Figure 15. Six systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram négatif.	32
Figure 16. Modèle du T1SS impliqué dans la sécrétion de la protéine HlyA	33
Figure 17. Modèle de sécrétion par le T1SS pour les protéines RTX.	36
Figure 18. Modèle de sécrétion de HasA par le T1SS.	37
Figure 19. Représentation schématique d'assemblage du T3SS de <i>P. aeruginosa</i>	40
Figure 20. Complexe du corps basal du T3SS de <i>S. typhimurium</i>	41
Figure 21. Structure cristalline du complexe SipA-InvB.....	42
Figure 22. Structures de domaines N-terminaux de protéines du translocon et des chaperons.	43
Figure 23. Structures de chaperons de classe III.	44
Figure 24. Modèle de reconnaissance du complexe chaperon-effecteur par le T3SS.	47
Figure 25. Organisation du T4SS chez <i>A. tumefaciens</i>	49
Figure 26. Structure cristalline d'ATPases de T4SS.	50
Figure 27. Structure et localisation du complexe de base de T4SS.	51
Figure 28. Modèles de T4SSs.	53
Figure 29. Structure du complexe VirE1/VirE2.	55
Figure 30. Représentation schématique des différents groupes du T5SS.	58
Figure 31. Structures du domaine β de T5aSS et T5cSS.....	59
Figure 32. Modèle de sécrétion par le T5SS avec l'assistance du complexe Omp85.....	60
Figure 33. Biogenèse des autotransporteurs monomériques.	61
Figure 36. Organisation des gènes de T2SS chez différentes espèces.	69
Figure 37. Représentation schématique de T2SS.	70
Figure 38. Organisation générale de différentes sécrétines (D'après Reichow <i>et al.</i> , 2010).....	71
Figure 39. Structure du domaine N-terminal de GspD d' <i>E. coli</i> ETEC.	72
Figure 40. Structures des domaines N-terminaux des structures de XcpQ de <i>P. aeruginosa</i> (4E9J) et GspD d' <i>E. coli</i> (3EZI).....	73
Figure 41. Superpositions des sous-domaines N0/N1 de GspD et d'EscC d' <i>E. coli</i> EPEC.	74
Figure 42. Reconstitution tridimensionnelle de la sécrétine PulD de <i>K. oxytoca</i>	75
Figure 43. Structure de la sécrétine GspD de <i>V. cholerae</i> dans un état « fermé ».	76
Figure 44. Superposition des structures 3D des domaines N0, N1, N2 et N3 (prédiction) de GspD d' <i>E. coli</i> avec le modèle 3D de la sécrétine dans son état « fermé».	77
Figure 45. Structures de pilotines.....	79

Figure 46. Structure de la pilotine OutS en complexe avec le peptide C-terminal de la sécrétine OutD.	80
Figure 47. Mécanisme possible du fonctionnement de la pilotine.....	80
Figure 48. Représentation schématisée des protéines OutC de <i>D. dadantii</i> et XcpP de <i>P. aeruginosa</i>	83
Figure 49. Structure du domaine PDZ3 de la protéine PSD95 en complexe avec son substrat.	83
Figure 50. Deux formes de l'hexamère formé par DegP.....	84
Figure 51. Structure cristallographique du domaine PDZ d'EpsC de <i>V. cholerae</i>	86
Figure 52. Structure du domaine HR d'OutC de <i>D. dadantii</i> . (Gu <i>et al.</i> , 2012 ; 2LNV).....	87
Figure 53. Comparaison des domaines HR d'OutC et PilP.	87
Figure 55. La biogenèse du pseudopilus.....	90
Figure 56. L'alignement des séquences signal de la piline PilA de T4P et des pseudopilines de Xcp de <i>P. aeruginosa</i>	91
Figure 57. Structures cristallines des pseudopilines.....	92
Figure 58. Comparaison des structures de pseudopilines majeures avec les pilines de T4P.....	92
Figure 59. Structure de la pseudopiline GspG de <i>V. cholerae</i>	93
Figure 60. Structure du pilus formé par des monomères de PulG.	95
Figure 61. Structure de l'hétérotrimère GspKIJ d' <i>E. coli</i> ETEC.....	96
Figure 62. Modèle de l'assemblage de pilus.....	97
Figure 63. Modèle du fonctionnement du pseudopilus par le principe du piston.	98
Figure 64. Modèle du fonctionnement du pseudopilus par le principe de la vis d'Archimède.	99
Figure 65. Représentation schématisée de la structure des ATPases de la famille AAA.....	101
Figure 66. Structure d'EpsE de <i>V. cholerae</i>	101
Figure 67. Changement conformationnel de XpsE provoqué par la fixation de l'ATP ou de XpsL.....	102
Figure 68. Structures cristallines des hexamères GspE ^{ΔN1} -Hcp1.	103
Figure 69. Modèle de sécrétion par T2SS impliquant l'ATPase.	104
Figure 70. Organisation de GspF.	104
Figure 71. Dimère formé par deux domaines cytoplasmiques d'EpsF (cyto-EpsF) de <i>V. cholerae</i>	105
Figure 72. Représentation de GspL.	106
Figure 73. Structure cristallographique du domaine cytoplasmique d'EspL (GspL de <i>V. cholerae</i>).....	107
Figure 74. Interactions entre le domaine N1 d'EpsE et la partie cytoplasmique d'EspL.	108
Figure 75. Structure de dimère du domaine périplasmique d'EspL de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	109
Figure 76. Représentation de GspM.....	109
Figure 77. Comparaison de dimères formés par les domaines périplasmiques d'EspL et EpsM.....	110
Figure 78. Modèle de l'organisation des composants GspE, GspL et GspM.....	111
Figure 79. Modèle de sécrétion de l'élastase chez <i>P. aeruginosa</i> incluant la formation des ponts disulfure.	115
Figure 80. Substrats sécrétés par divers T2SS.	118
Figure 81. Structures des protéines sécrétées par le système Out de <i>D. dadantii</i>	118

Section « Résultats ».

Figure 1. Mécanisme réactionnel du <i>pBpa</i> .	125
Figure 2. Incorporation du <i>pBpa</i> <i>in vivo</i> et pontage UV.	126
Figure 3. Efficacité de l'incorporation du <i>pBpa</i> dans Pell chez les différentes souches d' <i>E. coli</i> .	127
Figure 4. Efficacité de l'incorporation du <i>pBpa</i> chez <i>E. coli</i> MC4100 dans milieux différents.	128
Figure 5. Représentation schématique de vecteurs utilisés dans ce travail.	129
Figure 6. Mise au point du temps d'exposition aux UV chez <i>E. coli</i> .	130
Figure 7. Dynamique de la sécrétion des pectate lyases chez <i>D. dadantii</i> .	131
Figure 8. Dynamique de la production et du pontage de variant OutCK239 <i>pBpa</i> chez <i>D. dadantii</i> .	132
Figure 9. Schéma de pontage dirigé chez <i>D. dadantii</i> .	133
Figure 11. Positions sélectionnées pour l'incorporation du <i>pBpa</i> dans le domaine Fn3 de Pell.	135
Figure 12. Efficacité de l'incorporation du <i>pBpa</i> dans la boucle 3 de Pell.	136
Figure 13. Pontage dirigé <i>in vivo</i> de la boucle 3 chez <i>E. coli</i> MC4100.	137
Figure 14. Test de sécrétion de variants de Pell portant le <i>pBpa</i> chez <i>D. dadantii</i> <i>pell</i> ⁻ .	138
Figure 15. Pontage dirigé <i>in vivo</i> chez <i>D. dadantii</i> <i>pell</i> ⁻ .	139
Figure 16. Pontage dirigé du variant Pell D58 <i>pBpa</i> chez <i>D. dadantii</i> .	139
Figure 17. Effet du domaine PDZ sur la formation de complexes par Pell D58 <i>pBpa</i> .	141
Figure 18. Représentation et fonctionnalité du domaine PDZ d'OutC-h23.	142
Figure 19. Pontage dirigé du variant Pell D58 <i>pBpa</i> en présence du domaine PDZ sauvage ou PDZ-h23.	143
Figure 20. Instabilité du complexe Pell D58 <i>pBpa</i> -OutC.	143
Figure 21. Détection de complexes formés par Pell D58 <i>pBpa</i> dans les fractions cellulaires de <i>D. dadantii</i> <i>kdgK</i> A576.	145
Figure 22. Immunoprécipitation de complexes formés par Pell D58 <i>pBpa</i> .	146
Figure 23. Résultats de différents tests d'immunoprécipitation de complexes formés par Pell D58 <i>pBpa</i> .	148
Figure 24. Représentation schématique des interactions de Pell D58 <i>pBpa</i> .	149
Figure 25. Pontage dirigé des régions non-structurées du domaine Fn3 de Pell chez <i>D. dadantii</i> <i>kdgK</i> .	152
Figure 26. Résidus situés dans les brins β du domaine Fn3 de Pell sélectionnés pour l'incorporation du <i>pBpa</i> .	153
Figure 27. Pontage dirigé de brins- β du domaine Fn3 de Pell chez <i>D. dadantii</i> .	154
Figure 28. Positions dans le linker entre les domaines Fn3 et catalytique de Pell sélectionnées pour l'incorporation du <i>pBpa</i> .	155
Figure 29. Test de sécrétion de variants Pell portant le <i>pBpa</i> dans le linker entre le domaine Fn3 et domaine catalytique.	156
Figure 30. Pontage dirigé chez <i>D. dadantii</i> <i>pell</i> ⁻ du linker entre deux domaines de Pell.	157
Figure 31. Pontage dirigé <i>in vivo</i> de variants Pell A106 <i>pBpa</i> et Pell A109 <i>pBpa</i> .	158
Figure 32. Pontage dirigé <i>in vivo</i> du variant Pell A109 <i>pBpa</i> .	159
Figure 33. Positions dans le domaine catalytique de Pell sélectionnées pour l'incorporation du <i>pBpa</i> .	160
Figure 34. Test de sécrétion de variants de Pell portant le <i>pBpa</i> dans le domaine catalytique.	161
Figure 35. Pontage dirigé du domaine catalytique de Pell chez <i>D. dadantii</i> <i>pell</i> ⁻ .	162
Figure 36. Test de sécrétion de formes courtes de Pell.	163
Figure 37. Structures de Pell entière et une de forme courte (Pellc D223).	164
Figure 38. Sécrétion de formes courtes de Pell en présence et en absence du domaine PDZ d'OutC.	164
Figure 39. Résidus dans le domaine PDZ sélectionnés pour l'incorporation du <i>pBpa</i> .	167
Figure 40. Efficacité de l'incorporation du <i>pBpa</i> dans le domaine PDZ chez <i>E. coli</i> MC4100.	168
Figure 41. Pontage dirigé ciblant l'hélice- α B du domaine PDZ d'OutC.	168
Figure 42. Effet d'OutD et de pectinases sur la formation du complexe par OutCK239 <i>pBpa</i> .	169
Figure 43. Pontage dirigé du variant OutC K239 <i>pBpa</i> chez <i>D. dadantii</i> Δ outC.	171
Figure 44. Pontage dirigé du domaine PDZ d'OutC (brins β A et β B) chez <i>D. dadantii</i> .	171
Figure 45. Pontage dirigé du variant OutC M194 <i>pBpa</i> chez <i>D. dadantii</i> Δ outC.	172
Figure 46. Superposition du domaine HR d'OutC et de la région périplasmique de PilP.	174
Figure 47. Résidus du linker du domaine HR d'OutC sélectionnés pour l'incorporation du <i>pBpa</i> .	174

Figure 48. Efficacité de l'incorporation du <i>pBpa</i> dans le linker du domaine HR d'OutC.....	175
Figure 49. Pontage dirigé du linker du domaine HR d'OutC chez <i>E. coli</i> MC4100.	176
Figure 50. Pontage dirigé de variants OutC E127 <i>pBpa</i> et OutC N132 <i>pBpa</i>	177
Figure 51. Pontage dirigé de variants OutC E127 <i>pBpa</i> et OutC N132 <i>pBpa</i>	177
Figure 52. Effet d'OutE, OutL et OutM sur la formation de complexes par les variants d'OutC E126, E127 et N132	178
Figure 53. Représentations schématiques des interactions détectées chez <i>E. coli</i> grâce à l'incorporation de <i>pBpa</i> dans le linker du domaine HR d'OutC.	179
Figure 54. Résidus du domaine HR d'OutC sélectionnés pour l'incorporation du <i>pBpa</i>	180
Figure 55. Efficacité de l'incorporation du <i>pBpa</i> dans le domaine HR.....	181
Figure 56. Pontage dirigé ciblant les brins β du domaine HR d'OutC.	182
Figure 57. Pontage dirigé du variant OutC M101 <i>pBpa</i> chez <i>E.coli</i> MC4100.	182
Figure 59. Effet de la pectate lyase PelB sur l'organisation des domaines HR.	184
Figure 60. Pontage dirigé du variant OutC M101 <i>pBpa</i> chez <i>D. dadantii</i> $\Delta outC$ A3556.....	185
Figure 61. Représentation des interactions entre le domaine HR d'OutC et la sécrétine OutD.....	186

Abréviations

ABC : ATP Binding Cassette

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

Bam : β -barrel assembly machinery

*p*Bpa: para-benzoyl-L-phénylalanine

Da : Dalton

DNA : Desoxyribonucleotide

DO₆₀₀ : Densité optique à 600 nm

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

GFP : Green fluorescent protein

GTP : Guanosine triphosphate

IM : Inner membrane

IMP : Protéine intégrale de membrane interne

LB : Luria Bertani

LC-MS-MS : Liquid chromatography coupled with two mass spectrometry

LPS : Lipopolysaccharide

ME : Membrane externe

MI : Membrane interne

OM : Outer membrane

OMA : Outer membrane auxiliary

OMP : Outer membrane integral protein

OMP85 : Outer membrane protein 85

PCR : Polymerase chain reaction

PDZ : Post synaptic density 95, Disc large, Zo-1

POTRA : Polypeptide translocation associated

PVDF : Polyvinylidène fluoride

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis

SRP : Signal recognition particle

t-ARN : ARN de transfert

Tat : Twin arginine translocation

TF : Trigger factor

TMS : Segment transmembranaire

TPR : Tretratricopeptide repeats

Introduction bibliographique

Introduction générale.

L'enveloppe des bactéries joue un rôle indispensable pour leur survie. Elle protège le cytoplasme et son contenu des facteurs externes et permet l'interaction avec l'environnement, incluant les autres bactéries et les organismes hôtes. Les bactéries à Gram positif possèdent une enveloppe constituée d'une unique membrane qui est protégée de l'extérieur par une épaisse couche de peptidoglycane (Figure 1A). L'enveloppe des bactéries à Gram négatif est constituée d'une membrane cytoplasmique, ou interne, et d'une membrane externe séparée par un espace intermédiaire nommé périclasme qui contient une fine couche de peptidoglycane. L'unique membrane des bactéries à Gram positif est organisée de la même manière que la membrane interne des bactéries à Gram négatif : deux couches de phospholipides sont disposées en miroir. La membrane externe des bactéries à Gram négatif est asymétrique, elle est composée d'une couche interne de phospholipides et d'une couche mixte composée de lipopolysaccharides et phospholipides (Figure 1B).

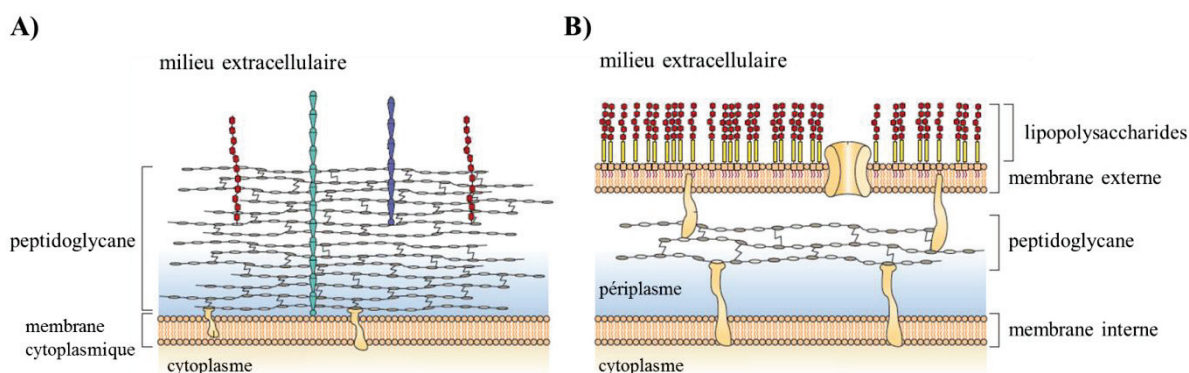


Figure 1. Composition de l'enveloppe bactérienne.

A) Enveloppe des bactéries à Gram positif. Le peptidoglycane est lié à des acides teichoïques (en violet) et lipoteichoïques (en vert) et des polysaccharides (en rouge). B) Enveloppe des bactéries à Gram négatif (d'après Albers & Meyer, 2011).

La composition et la complexité de l'enveloppe des bactéries ont une forte influence sur leur mode de vie et leurs interactions avec l'environnement. D'une part, l'enveloppe doit protéger la cellule de molécules toxiques et nuisibles et, d'autre part, permettre l'entrée des nutriments et la sécrétion de différentes molécules, y compris des protéines.

Dans le cas de bactéries à Gram positif, les protéines à sécréter ne traversent qu'une seule membrane cytoplasmique et ce processus peut être assuré par un des systèmes d'exportation, Sec, qui prend en charge les protéines sous une forme non repliée, et Tat qui exporte des protéines sous une forme repliée.

Chez les bactéries à Gram négatif, la présence de deux barrières hydrophobes, les membranes cytoplasmique et externe, rend la sécrétion plus complexe. Afin de contourner ces obstacles, plusieurs systèmes de sécrétion spécialisés ont été développés chez les bactéries à Gram négatif. A l'heure actuelle, on en connaît six. Certains de ces systèmes permettent la sécrétion en une seule étape du cytoplasme au milieu extracellulaire (le système de sécrétion de type I) ou directement dans la cellule-hôte (les systèmes de sécrétion de type III, IV et VI). Les autres types de sécrétion (les systèmes de type II et V) s'effectuent en deux étapes en utilisant les systèmes d'exportation Sec et Tat pour passer la membrane interne.

Dans les chapitres suivants, j'ai choisi de présenter les systèmes d'exportation Sec et Tat aussi que les six systèmes de sécrétion identifiés chez les bactéries à Gram négatif. Le système de sécrétion de type II (T2SS) qui fait objet de cette étude est présenté plus en détail.

Exportation des protéines.

I. Le système Sec.

I.1. Introduction.

Chez les procaryotes, la membrane cytoplasmique constitue la première barrière à traverser par les protéines. Chez les bactéries à Gram négatif, cette membrane est aussi appelée la membrane interne. Des protéines peuvent être intégrées dans cette membrane ou être transportées dans le périplasma. Ce processus est nommé translocation. La majorité des protéines traverse la membrane cytoplasmique sous forme non repliée grâce au système Sec. Cette machinerie est aussi indispensable pour l'insertion de protéines dans la membrane. Le système Sec représente la voie principale d'exportation chez les bactéries et un système équivalent existe chez les archées et les eucaryotes (Cao & Saier, 2003). Le système Sec est composé de deux complexes, SecYEG et SecDFYidC (YaiC), qui forment un pore dans la membrane cytoplasmique à travers lequel les protéines traversent cette membrane (Figure 2).

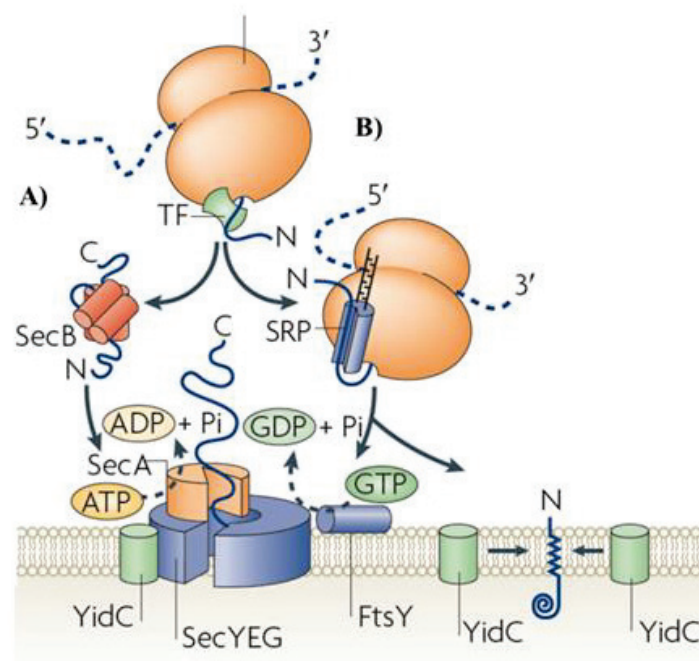


Figure 2. Voie générale d'exportation par le système Sec.

A) exportation post-traductionnelle. B) exportation co-traductionnelle. (Adapté de Cross *et al.*, 2009).

L'adressage de la protéine à exporter par le système Sec repose sur le couple SecA-SecB (exportation post-traductionnelle, Figure 2A) ou sur SRP (Signal Recognition Particle) et son récepteur membranaire FtsY (exportation co-traductionnelle, Figure 2B) (Cross *et al.*, 2009).

I.2. La séquence signal Sec et le fonctionnement du système Sec.

Les protéines exportées par le système Sec sont synthétisées dans le cytoplasme sous la forme d'un précurseur possédant une séquence signal N-terminale qui doit être clivée pendant l'exportation. Cette séquence contient normalement de 20 à 30 résidus et possède une organisation conservée (Figure 3) :

- la région N-terminale qui porte une charge positive (région N)
- la région hydrophobe d'environ 8-12 acides aminés (région H)
- la région polaire qui contient le site de clivage de signal peptidases LspA ou LepB selon le type de protéines (région C)

Un des rôles de ces régions est de distinguer les protéines à sécréter des protéines cytoplasmiques.

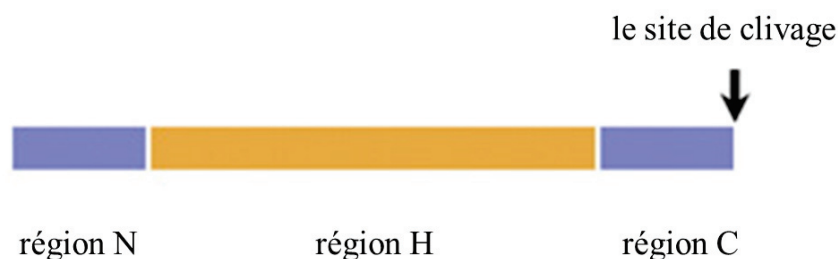


Figure 3. Présentation schématique d'un peptide signal N-terminal des substrats du système Sec.

La région N porte une charge nette positive, la région H est hydrophobe, la région C est polaire et contient le site de clivage des signal peptidases LspA ou LepB selon le type de protéines (Natale *et al.*, 2008).

La séquence signal Sec est située à l'extrémité N-terminale de la protéine à exporter. Cette partie est la première à être synthétisée sur le ribosome et elle va interagir avec la protéine TF (Trigger Factor). Ensuite, cette séquence va permettre l'adressage de la protéine au système Sec, soit de la manière post-traductionnelle (Figure 2A), soit co-traductionnelle (Figure 2B).

Dans le cas de l'exportation co-traductionnelle (Figure 2B), le rôle principal est attribué à SRP (signal recognition particle), une ribonucléoprotéine composée de la protéine Ffh et de l'ARN 4,5S (Pool, 2005). La SRP interagit avec les séquences signal Sec qui contiennent une région H très hydrophobe, cette interaction va déplacer le TF, ralentir la traduction et permettre la fixation de SRP sur le récepteur membranaire FtsY. Grâce à l'interaction entre SRP et FtsY le complexe ribosome-chaîne peptidique va être transféré vers le complexe SecYEG (Halic *et al.*, 2006). Après la dissociation de SRP et FtsY grâce à l'hydrolyse de GTP, la traduction va continuer et donner l'énergie à la machinerie Sec pour l'exportation de la protéine en cours de synthèse. Cette voie est aussi impliquée dans l'insertion des protéines membranaire.

Exportation des protéines destinées au périplasma possède un mécanisme différent, caractérisé comme post-traductionnel (Figure 2A). Les séquences signal de ces protéines possèdent la région H moins hydrophobe, SRP ne va pas interagir avec elles et la traduction ne va pas ralentir. Les protéines vont être synthétisées dans le cytoplasme et interagir avec le chaperon SecB qui va les maintenir dans un état non replié et compatible avec l'exportation (Randall *et al.*, 1997). Le chaperon SecB va transporter la protéine à exporter vers le composant SecA qui assure la spécificité de l'exportation et se fixe sur le complexe SecYEG. Pour la translocation quelques étapes supplémentaires sont indispensables : l'interaction entre SecA et SecYEG et la fixation d'ATP par SecA, ce qui va initialiser la translocation de la protéine à travers de la membrane interne. SecA utilise l'hydrolyse de l'ATP pour tirer la protéine non repliée à travers son pore. Le complexe SecDF est important dans les dernières étapes de translocation pour libérer la protéine dans le périplasma.

I.3. Les composants du système Sec.

I.3.1 Le complexe SecYEG.

Le complexe hétérotrimérique SecYEG joue le rôle principal dans l'exportation post-traductionnelle et co-traductionnelle. Il forme un pore à travers lequel les protéines à sécréter traversent la membrane interne. Des études de reconstitution réalisées avec le complexe purifié SecYEG ont montré que la présence du complexe SecYEG et de la protéine motrice SecA est suffisante pour assurer la translocation (Brundage *et al.*, 1990). SecY est la protéine centrale de ce complexe, organisée en hélices- α (TM1-TM10), six régions cytoplasmiques et cinq régions périplasmiques (Figure 4).

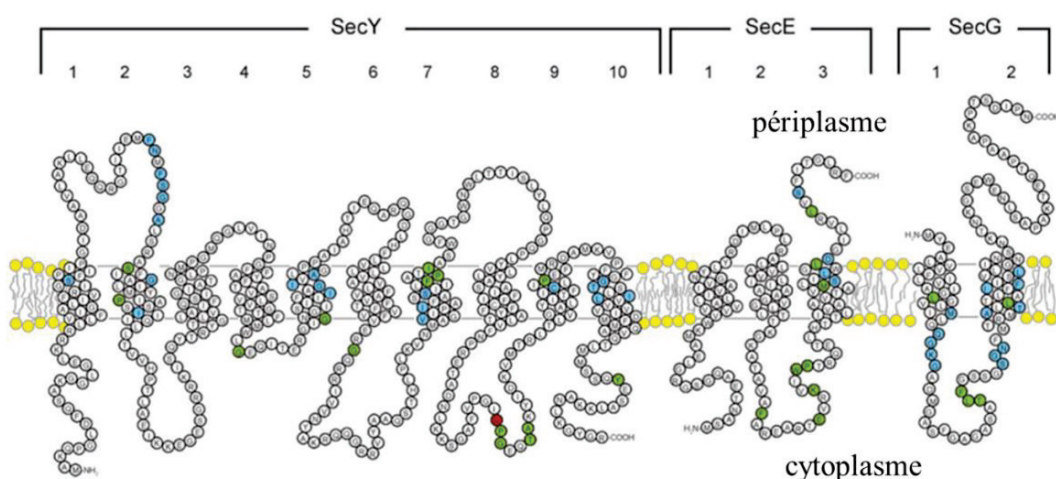


Figure 4. Topologie de protéines SecY, SecE et SecG (Veenendaal *et al.*, 2004).

La protéine SecG d'*E. coli* possède deux régions transmembranaires, ces extrémités N et C-terminale se retrouvent dans le périplasma. Cette protéine n'est pas essentielle pour la

translocation chez *E. coli*, mais sa présence augmente l'efficacité de translocation. SecG interagit de manière indépendante avec SecY et SecE (Homma *et al.*, 1997) et les études de pontage chimique ont démontré que la partie N-terminale de SecY est impliquée dans ces interactions (Tam *et al.*, 2005). L'analyse structurale du complexe SecYE β (un homologue de SecG) de *Methanococcus jannaschii* a confirmé ces résultats (Mori *et al.*, 2004 ; Satoh *et al.*, 2003 ; van der Sluis *et al.*, 2002). Le rôle exact de la protéine SecG reste inconnu et, si elle n'est pas essentielle à la translocation *in vitro* (Brundage *et al.*, 1990), elle augmente l'efficacité de l'exportation *in vivo* (Nishiyama *et al.*, 1994).

La structure de SecYE β de *M. jannaschii* a permis de clarifier l'organisation du pore de translocation et démontrer qu'il est formé par dix segments transmembranaires (van den Berg *et al.*, 2004).

Les deux structures cristallines des complexes SecYEG de *T. maritima* (Figure 5A) et SecYE β de *M. jannaschii* n'ont pas les mêmes caractéristiques. La structure de SecYE β semble correspondre à l'état fermé du pore. Inversement, la structure de *M. jannaschii* représente un état du pore semi-ouvert (Figure 5B).

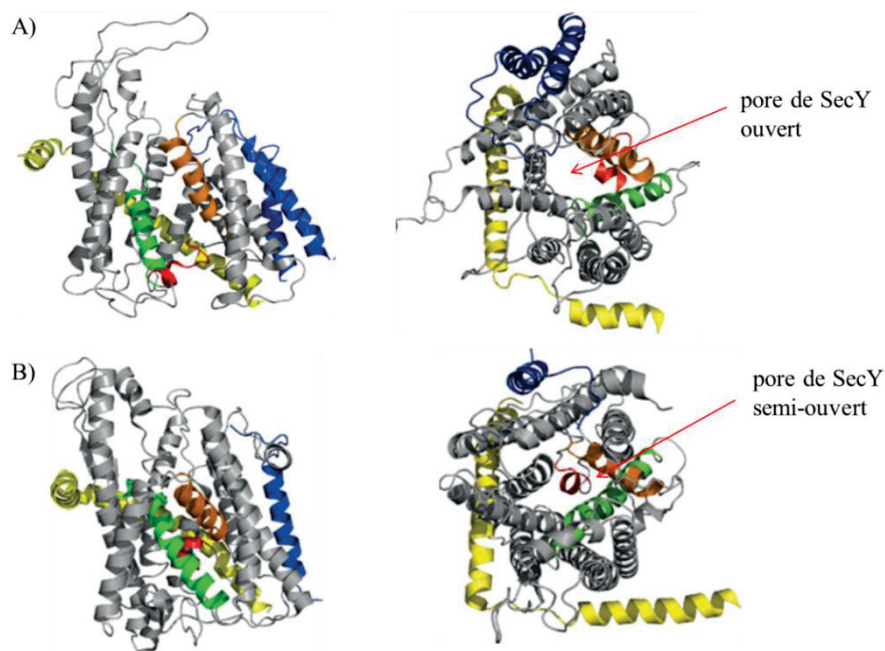


Figure 5. Structure cristalline de différents complexes SecYE(G/β).

Vue de coté (à gauche) et du cytoplasme (à droite) de A) *T. maritima* (3DIN) et B) *M. jannaschii* (1RH5). SecY est présenté en gris, les hélices latérales TMS2 (orange), TMS7 (vert), SecE (jaune) et SecG/β (bleu) (D'après Lycklama a Nijeholt & Driessen, 2012).

Plusieurs études ont démontré des interactions directes entre SecG et SecA (Mori *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1998). La structure de SecYEG complexé avec SecA a démontré que la boucle cytoplasmique de SecG est située proche de SecA (Zimmer *et al.*, 2008). Des études de pontage

dirigé *in vivo* ont confirmé cette interaction (Das & Oliver, 2011). Ensemble, ces données suggèrent que SecE interagit avec SecA et provoque les changements conformationnels qui vont faciliter la fixation d'ATP et la translocation de protéines (Mori *et al.*; 2006).

SecE d'*E. coli* possède trois régions transmembranaires (Figure 4), mais la protéine homologue Sec61 γ chez eucaryotes n'en possède qu'une seule (Papanikolau *et al.*, 2007). La partie la mieux conservée de SecE est la région qui connecte les deux hélices- α positionnées à coté de la protéine SecY (Murphy & Beckwith, 1994). Cette région, associée à la troisième région transmembranaire, est essentielle pour la stabilité du complexe SecY-SecE (Pohlschroder *et al.*, 1996). Quand SecY se dissocie de ce complexe, elle est rapidement dégradée par la protéase membranaire FtsH (Kihara *et al.*, 1995), ce qui montre la nécessité et l'importance de SecE pour le fonctionnement du système Sec.

I.3.2 Le chaperon SecB.

La protéine SecB est un chaperon qui interagit avec les précurseurs des protéines en les stabilisant et en les protégeant contre l'agrégation (Bechtluft *et al.*, 2007). SecB interagit avec la séquence signal Sec, cette interaction est indispensable pour l'exportation (Zhou & Xu, 2005). La structure de SecB d'*E. coli* a été résolue. SecB est constituée de quatre brins- β antiparallèles et deux hélices- α (Xu *et al.*, 2000) (Figure 6A).

La protéine SecB interagit avec les substrats sous la forme d'une homotétramère (Figure 6B) (Zhou & Xu, 2005 ; Natale *et al.*, 2008). Des études biochimiques ont suggéré l'existence de deux sites d'interaction potentiels : un site d'interaction avec des brins- β exposés et un autre, impliqué dans l'interaction avec les régions hydrophobes (Crane *et al.*, 2006) (Figure 6C). Ces données sont cohérentes avec la structure cristalline du tétramère de SecB (Zhou & Xu, 2005 ; Natale *et al.*, 2008) (Figure 6C, 6B).

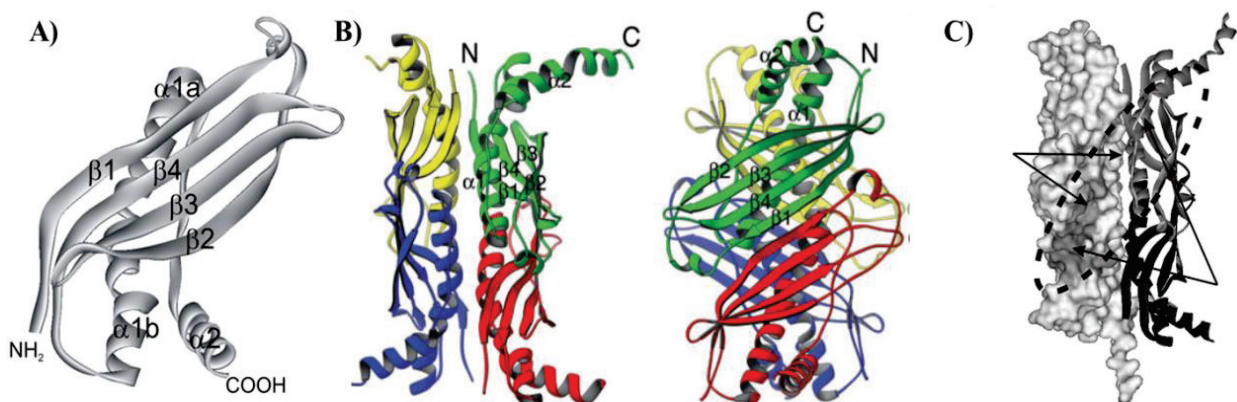


Figure 6. Structure de SecB.

A) monomérique et B) tétramérique (vue de deux cotés). Chaque monomère est représenté avec une couleur différente. C) représentation du site de fixation des substrats. (Zhou & Xu, 2005 ; Xu *et al.*, 2000).

SecB transporte la protéine à exporter vers les composants SecYEG du système Sec situé dans la membrane plasmique. SecB interagit directement avec SecA et assure le passage de substrat vers cette protéine (Randall & Henzl, 2010) (Figure 7A).

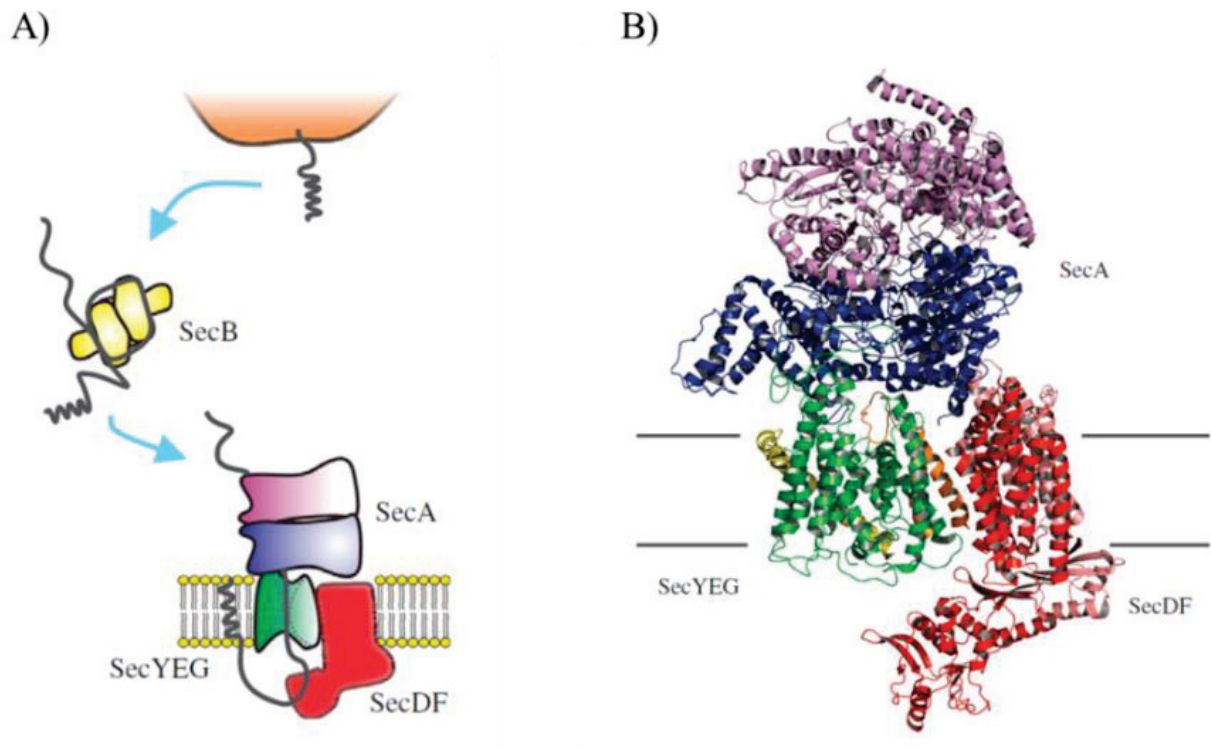


Figure 7. Modèle d'exportation post-traductionnelle.

A) Représentation schématique. B) Modèle structural de la translocase Sec. Une copie de SecA de *Thermotoga maritima* (violet) est positionnée sur un autre protomère (bleu) associé au SecYEG (vert/jaune/orange, 3DIN). Le complexe SecDF de *Thermus thermophilus* (rouge/rose, 3AQP) est placé à côté de SecG (Lycklama a Nijeholt & Driessen *et al.*, 2012).

I.3.3 La protéine motrice SecA.

La protéine SecA est un composant indispensable pour l'exportation post-traductionnelle. SecA reçoit les substrats à exporter du chaperon SecB et les transfère vers le complexe SecYEG (Figure 7A). SecA est une ATPase, qui fonctionne comme le moteur moléculaire de translocation. Chez *E. coli*, c'est une protéine de 901 acides aminés (102 kDa) composée de plusieurs domaines (Figure 8) : le domaine DEAD qui est constitué du domaine NBD (nucleotide binding domain) et du domaine IRA2 (régulateur intramoléculaire de ATPase2) ; le domaine PBD (pre-protein binding domain) ; le domaine SD (helical scaffold domain) ; IRA1 (régulateur intramoléculaire de ATPase2) ; et le domaine C-terminal (y compris le domaine WD, helical wing domain) (Papanikolaou *et al.*, 2007).

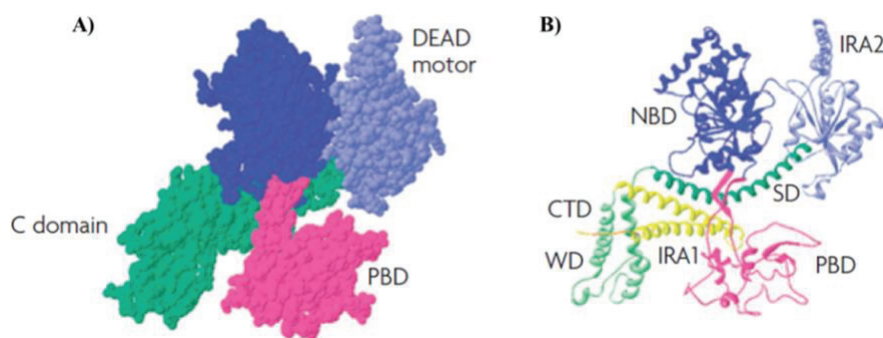


Figure 8. Représentation de la protéine SecA.

A) Les domaines sont représentés avec les couleurs suivantes : le domaine DEAD en bleu, le domaine NBD (bleu foncé) et IRA2 (mauve), le domaine PBD (rose), le domaine C-terminal (vert). B) Les différents sous-domaines de SecA représentés en structure secondaire (D'après Papanikolau *et al.*, 2007)

La structure complexe de SecA et sa co-localisation dans le cytoplasme et dans la membrane interne prouvent la diversité de ses fonctions, notamment, l'interaction avec des nucléotides, le chaperon SecB, les précurseurs de protéines, les phospholipides membranaires et le complexe SecYEG (du Plessis *et al.*, 2011). Plusieurs travaux ont démontré que la protéine SecA peut exister sous deux formes, monomérique et dimérique. L'équilibre entre ces deux formes est dépendant des conditions : de la concentration en sel et de la température (Wowor *et al.*, 2011), de la présence d'ATP (Shin *et al.*, 2006), de phospholipides (Benach *et al.*, 2003) et des peptides signal (Shin *et al.*, 2006; Benach *et al.*, 2003; Musial-Siwiek *et al.*, 2005). Il a été démontré que SecA interagit avec SecB sous une forme dimérique (Fekkes *et al.*, 1997). Cependant, l'état fonctionnel de SecA en interaction avec SecYEG reste inconnu (Zimmer *et al.*, 2008 ; Duong, 2003).

Actuellement, cinq structures de dimères de SecA ont été résolues (Papanikolau *et al.*, 2007 ; Hunt *et al.*, 2002 ; Sharma *et al.*, 2003 ; Zimmer *et al.*, 2006 ; Vassilyev *et al.*, 2006) (Figure 9). Bien que les protomères de SecA soient bien conservés dans ces structures, leurs interfaces de dimérisation sont différentes. A l'exception des domaines WD et CTD, chaque domaine participe à la formation de l'interface du dimère au moins dans une des structures. De plus, dans toutes ces structures, le domaine DEAD se trouve dans l'interface de dimère, bien que les acides aminés impliqués varient selon la structure considérée. L'extrémité N-terminale est impliquée dans l'interface du dimère antiparallèle de SecA de *Bacillus subtilis* (Hunt *et al.*, 2002).

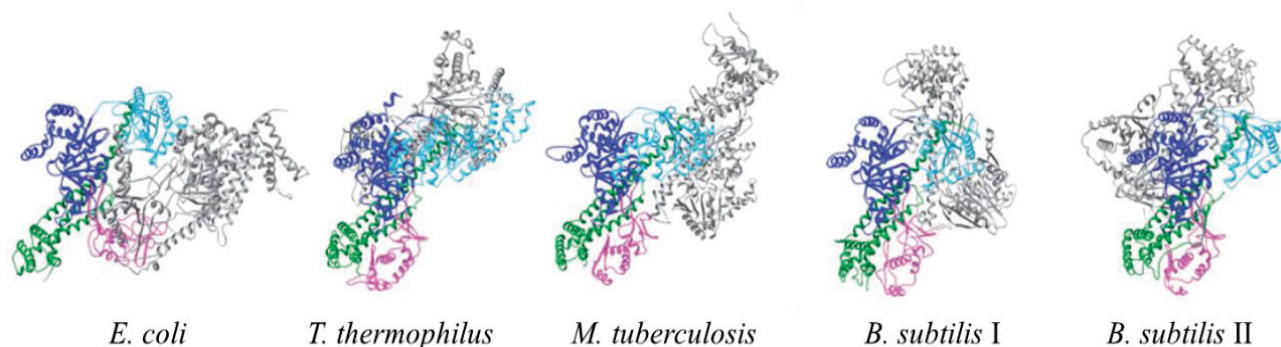


Figure 9. Différentes structures du dimère SecA.

Un des monomères est coloré comme sur la Figure 8B, un autre est représenté en gris. Le dimère de SecA d'*E. coli* (2FSF), *T. thermophilus* (2IPC), *M. tuberculosis* (1NL3), *B. subtilis* I (2BIM) et II (1M6N) (D'après Papanikolau *et al.*, 2007).

Les études réalisées par la résonance magnétique nucléaire ont démontré que le domaine DEAD est dynamique et que sa flexibilité est dépendante de la présence de l'extrémité C-terminale (Keramisanou *et al.*, 2006). Le site d'interaction avec le précurseur de la protéine est situé entre deux domaines de SecA : le domaine C-terminal (vert, Figure 10) et le domaine PBD (pre-protein binding Figure 10, rose). Ces deux domaines ont les positions différentes dans les structures de SecA de *B. subtilis* (Figure 10A) et d'*E. coli* (Figure 10B). La position du domaine PDB par rapport au domaine C-terminal tourne de 75 degrés. Il est possible que ces deux structures représentent deux états fonctionnels de SecA : fermé (la structure de SecA de *B. subtilis*, Figure 10A) et ouvert (la structure de SecA d'*E. coli*, Figure 10B). Dans la forme ouverte, une grande cavité est située entre les deux domaines, PDB et C-terminal (Figure 10B), il est donc possible que cette partie soit impliquée dans la fixation de précurseur de la protéine et que les mouvements de ces domaines favorisent le passage du substrat vers le complexe SecYEG (Papanikolau *et al.*, 2006).

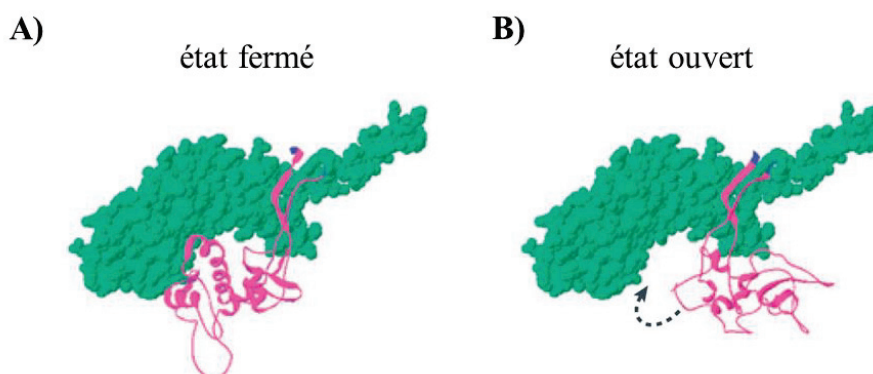


Figure 10. Deux formes structurales et fonctionnelles de SecA.

La forme fermée (à gauche) (structure de *B. subtilis*) et ouverte (à droite) de SecA (structure d'*E. coli*). Le domaine C-terminal est représenté en vert et le domaine PBD en rose (Papanikolau *et al.*, 2006).

I.3.4 Le complexe SecDFYidC (YajC).

Il a été démontré que le complexe SecYEG interagit avec le complexe membranaire SecDFYidC, et que cette interaction stimule la translocation de précurseur de protéine au travers de la membrane (Nouwen & Driessen, 2002). La protéine YajC interagit avec le complexe SecDF, mais elle n'est pas indispensable pour l'exportation. Les mutants *secD* et *secF* sont sensibles aux basses températures et leur efficacité d'exportation est fortement affectée (Nouwen & Driessen, 2002). Cependant, ces protéines ne sont pas indispensables à la translocation *per se*. Même si le rôle exact du complexe SecDF reste inconnu, il a été proposé que SecDF soit impliqué dans les dernières étapes de translocation et dans la biogenèse de la membrane interne (Nouwen & Driessen, 2002 ; du Plessis *et al.*, 2006). La structure du complexe SecDF de *T. thermophilus* a été résolue (Tsukazaki *et al.*, 2011). Il est constitué de 12 hélices transmembranaires et deux grandes régions périplasmiques (Figure 11). Cependant, la structure du domaine périplasmique isolé de SecD, P1, présente une conformation différente de celle qui fait partie du complexe SecDF (Tsukazaki *et al.*, 2011). Ces données ont permis de proposer un mécanisme de fonctionnement : le complexe SecDF agit comme un chaperon membranaire qui utilise l'énergie de la PMF pour accomplir la translocation. Cette fonction est dépendante de l'accessibilité du domaine P1 de SecD qui interagit avec le substrat.

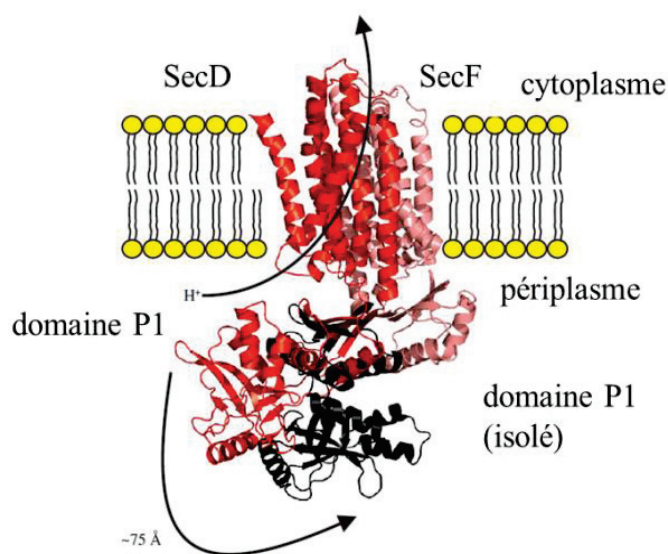


Figure 11. Structure et mécanisme de fonctionnement du complexe SecDF.

Le complexe SecDF de *T. thermophilus* est représenté par les couleurs suivants : SecF (rose), SecD (rouge). La structure du domaine périplasmique P1 de SecD qui a été résolue séparément, est en noir.

La protéine YidC facilite l'insertion de certaines protéines membranaires, elle peut fonctionner toute seule (Serek *et al.*, 2004; Dalbey *et al.*, 2011) ou ensemble avec le système Sec (Kol *et al.*, 2009; du Plessis *et al.*, 2011). Un homologue fonctionnel et structural de YidC a été

identifié dans les mitochondries et les chloroplastes, OxaI et Alb3, respectivement (Samuelson *et al.*, 2000; Kuhn *et al.*, 2003).

I.4 Le mécanisme de translocation par le système Sec.

Même si le mécanisme de translocation par le système Sec n'est pas encore connu dans le détail, on peut distinguer 3 étapes :

1. L'adressage de protéines.

Les protéines à exporter possèdent une séquence signal clivable à l'extrémité N-terminale. Chez les bactéries, SRP est majoritairement impliqué dans l'insertion des protéines dans la membrane cytoplasmique. Ces protéines possèdent une partie hydrophobe de séquence signal plus longue qui interagit plus spécifiquement avec SRP (Sijbrandi *et al.*, 2003). Les autres protéines à exporter interagissent avec SecB (Randall *et al.*, 2002). Dans les deux cas, le complexe SRP-protéine (Figure 12,1A) et SecB-protéine (Figure 12, 1B), la chaîne peptidique naissante est transportée vers le complexe SecYEG situé dans la membrane interne. Les protéines en complexe avec SRP vont être reconnues par le récepteur FtsY (de Gier & Luirink, 2003). Dans le cas de SecB, l'interaction avec SecA est strictement nécessaire.

2. Deuxième étape, la translocation.

Une fois prises en charge par SecB ou SRP, les protéines vont être ensuite transportées vers le complexe SecYEG situé dans la membrane cytoplasmique. Ces trois protéines qui correspondent aux Sec61 α , Sec61 γ et Sec61 β chez les eucaryotes, forment un canal dans la membrane à travers lequel des chaînes peptidiques vont être poussées par la protéine motrice SecA (Figure 12, 2).

3. Troisième étape, sortie et la maturation des protéines (Figure 12, 3).

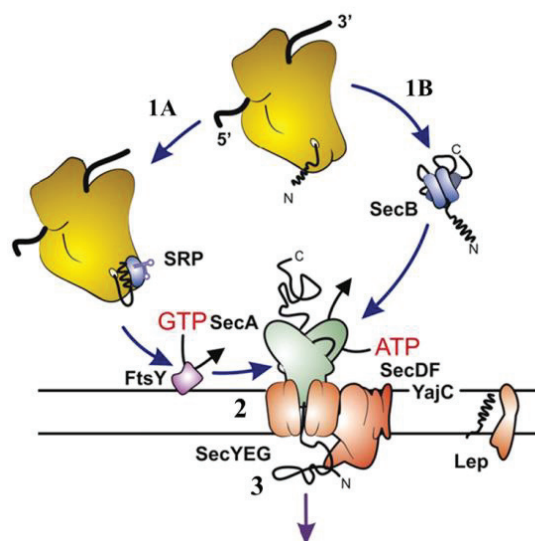


Figure 12. Etapes d'exportation par le système Sec.

(Voir les explications dans le texte).

Après la translocation, les protéines peuvent avoir des destins différents. Les protéines périplasmiques, les protéines à sécréter par le T2SS et le T5SS et les protéines destinées à la membrane externe doivent passer par l'étape de maturation qui comprend le clivage de séquence signal par les peptidases LepB ou par LspA pour les lipoprotéines (Facey & Kuhn, 2010). Les protéines périplasmiques vont se replier avec l'aide des chaperons périplasmiques Skp, SurA, DegP ou/et des chaperons spécifiques. Les protéines de la membrane cytoplasmique doivent être insérées correctement dans la bicouche lipidique. Les protéines de la membrane externe vont être transportées à travers le périplasma et insérées dans la membrane à l'aide des systèmes spécifiques : LolABC, pour lipoprotéines ; Bam, pour les protéines en tonneau- β et les pilotines pour les sécrétines.

II. Le système Tat.

II.1. Introduction.

L'existence d'un système d'exportation des protéines indépendant du système Sec a été découverte par Berks en 1996 (Berks, 1996). Il a été démontré que de nombreuses enzymes à cofacteur disposent d'une séquence signal avec un motif conservé SRRXFLK. Pour ces protéines un nouveau type de système d'exportation a été proposé, appelé Tat (pour « twin-arginine translocon »). La différence principale entre les translocons Sec et Tat est que le système Tat prend en charge des protéines sous la forme repliée dans cytoplasme. Le système Sec est bien conservé dans les règnes du vivant et représente la voie principale de passage des protéines à travers la membrane plasmique. Le système Tat est présent chez les bactéries (mais pas toutes), les archées, les thylakoïdes de plantes, les chloroplastes des algues et a été retrouvé dans les mitochondries de certaines éponges (Palmer & Berks, 2012). La quantité de substrats transportés par le système Tat est souvent moins abondante que ceux exportés par le système Sec. Pourtant le système Tat tient le rôle principal dans certains processus cellulaires, tels que la photosynthèse, la respiration cellulaire, l'acquisition du fer et du phosphate (Mickael *et al.*, 2010), la division cellulaire (Stanley *et al.*, 2001), la mobilité (Ochsner *et al.*, 2002), la résistance aux métaux et peptides antimicrobiens (Weatherspoon-Griffin *et al.*, 2011) et la fixation d'azote (Meloni *et al.*, 2003). Chez les bactéries pathogènes possédant le système Tat, il est impliqué dans la virulence (de Buck *et al.*, 2008).

II.2. L'importance du système Tat.

Le système Tat assure l'exportation des protéines préalablement repliées dans le cytoplasme. La translocation des protéines repliées à travers la membrane plasmique représente un cas rare car la majorité de systèmes de transport et sécrétion prennent en charge des protéines dépliées. Il

existe trois raisons principales qui nécessitent une utilisation du système Tat (Palmer & Berks, 2012) :

1. La protéine ne peut être repliée correctement qu'en présence de son cofacteur, qui ne peut s'intégrer à la protéine que dans le cytoplasme. Il est possible de distinguer deux grandes familles de cofacteurs associées au système Tat : les clusters à liaisons métal-soufre et les cofacteurs dérivés de nucléotides (NAD⁺, Cobalamine, etc.) (Berks *et al.*, 2000).

2. La protéine doit être repliée autour d'un ion métallique. Cependant, la concentration d'ion correspondant est souvent faible dans le périplasma, et suffisante dans le cytoplasme. Par exemple, une protéine MncA de *Synechocystis* sp. a besoin du Mn⁺² qui se fixe à MncA dans le cytoplasme où la concentration de cet ion est suffisante (Tottey *et al.*, 2008).

3. La protéine est un hétéromultimère où un des protomères ne possède pas la séquence signal Tat et ne peut être exporté qu'en complexe avec son partenaire. Par exemple, le complexe SoxYZ impliqué dans l'oxydation de thiosulfate (Sauve *et al.*, 2007).

Le système Tat est composé des protéines des familles TatA et TatC, qui sont situées dans la membrane cytoplasmique. Chez certains organismes, la présence d'une copie simple de TatA et TatC est suffisante pour l'exportation de substrat. Chez les autres, l'exportation implique un autre composant de la famille TatA, nommé TatB. Dans ce cas-là, les trois protéines sont indispensables pour la transportation.

En général, le système TatAC est répandu chez les bactéries à Gram positif avec un faible pourcentage de GC (dont *B. subtilis*) et chez les archées, alors que le système TatABC est présent chez les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif avec un haut pourcentage de GC (comme Actinobactéries) et dans les chloroplastes des plants (Palmer et Berks, 2012).

II.3. Les substrats du système Tat et la séquence signal Tat.

La quantité des protéines exportées par le système Tat varie chez les organismes différents. Les bactéries à Gram positif de la groupe Firmicutes, comme *B. subtilis* et *Staphylococcus aureus* ont peu de substrats prédits comme étant exportés par le système Tat (Dilks *et al.*, 2003). Au contraire, les Entérobactéries possèdent de 20 à 30 protéines exportées par Tat. La plus grande quantité de substrats exportés par Tat a été décrite chez les bactéries du genre *Streptomyces*, pour lesquelles une protéine sur six est exportée par le système Tat (Joshi *et al.*, 2010). Chez certaines archées halophiles, plus de 40% de protéines passent par la voie Tat (Dilks *et al.*, 2003).

Les protéines sont adressées au système Tat grâce à la présence d'une séquence signal portant le motif conservé twin-arginine. La séquence signal Tat a une organisation tripartite comme la séquence signal Sec. Leur comparaison est présentée sur la Figure 13.

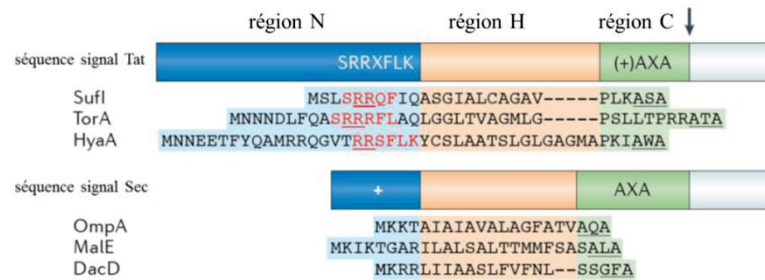


Figure 13. Comparaison des séquences signal Tat et Sec.

Les séquences signal sont composées de trois parties : la région N chargée positivement, la région H hydrophobe et la région C polaire. La région C contient normalement un site de reconnaissance de signal peptidase de type I ou II (Palmer & Berks, 2012).

Même si l'organisation des séquences signal Sec et Tat est similaire, elles ont des différences notables leur permettant d'assurer l'adressage au système de l'exportation approprié. La séquence Tat possède un motif fortement conservé, SRRXFLK, dans lequel les deux arginines conservés sont indispensables et le résidu X est polaire (Gouffi *et al.*, 2009). L'hydrophobicité de la région H est moins importante dans la séquence signal Tat par rapport à celle de Sec (Cristobal *et al.*, 2009), ce qui représente la différence la plus forte entre ces deux séquences. De plus, la région C de certaines séquences signal Tat possède des résidus basiques qui ne sont pas courants dans les séquences signal Sec. Pourtant, ces résidus basiques ne semblent pas être indispensables pour la reconnaissance par le système Tat (Blaudeck *et al.*, 2009). La région C contient un site de reconnaissance de la signal peptidase de type I ou II. La peptidase de type II est responsable du clivage de séquence signal des lipoprotéines, qui possède le site de reconnaissance $L_3(A/S/T)_2(G/A)_{-1}$ avec une cystéine conservée dans la position +1. Certaines lipoprotéines passent donc par le système Tat (Shruthi *et al.*, 2010).

Le système Tat est impliqué dans l'insertion des protéines dans la membrane interne. Dans ce cas, la protéine est ancrée par l'extrémité N-terminale et sa séquence signal Tat n'est pas clivée et fonctionne comme une ancre membranaire, par exemple dans le cas des protéines Rieske (des protéines fer-soufre) des chloroplastes et de *Legionella pneumophila* (Aldridge *et al.*, 2008).

II.4. Le mécanisme de translocation par le système Tat.

Dans le cas de transport des protéines sous une forme non repliée, le diamètre intérieur du pore de translocon peut avoir la même largeur que la chaîne peptidique (environ 12 Å). Par exemple, le pore du translocon Sec est formé par la multimérisation de la protéine SecY et son

ouverture-fermeture serait contrôlée par les mouvements des hélices alpha (Park & Rapoport, 2012). Au contraire, le système Tat d'*E. coli* est capable de transporter des substrats d'un diamètre variant de 20 à 70 Å (Berks *et al.*, 2000).

Le système Tat utilise l'énergie de la force proton motrice (FPM) et probablement, la force sodium motrice chez certains organismes (Kwan *et al.*, 2008). C'est-à-dire que l'ATP n'est pas nécessaire pour son fonctionnement (Yahr & Wickner, 2001). Il a été estimé que chaque translocation par le système Tat nécessite environ 10^5 protons de gradient soit l'équivalent d'environ 10^4 molécules d'ATP (Alder & Theg, 2003).

Le mécanisme de translocation par le système Tat a été étudié plus en détail chez *E. coli* et dans les thylakoïdes. Les deux systèmes possèdent trois composants, TatA, TatB et TatC, où TatB et TatC forment un complexe dans la membrane composé de 6 à 8 copies de chaque protéine (Bolhuis *et al.*, 2001). La protéine TatB contient une hélice transmembranaire et TatC possède six hélices transmembranaires (Punginelli *et al.*, 2007). De plus, la protéine TatC des thylakoïdes possède à l'extrémité N-terminale un domaine dont la fonction est inconnue et qui n'est pas présent chez *E. coli*.

Le cycle de translocation commence par la reconnaissance de séquence signal du substrat par le complexe TatBC (Figure 14, 1) (Cline & Mori, 2001 ; Gerard & Cline, 2007). Pour certains substrats, l'implication de chaperons spécifiques a été démontré (Papish *et al.*, 2003 ; Kostecki *et al.*, 2010). Après l'interaction du substrat avec le complexe TatBC, le signal twin-arginine se retrouve proche de la protéine TatC, alors que la partie hydrophobe de la région H se rapproche de TatB. TatC interagit avec le motif SRRXFLK et confère la spécificité du système Tat vis-à-vis de ce motif (Cline & Mori, 2001 ; Alami *et al.*, 2003). L'utilisation de la technique de pontage dirigé *in vivo* a démontré que la séquence signal Tat se fixe entre l'extrémité N-terminale et la première boucle cytoplasmique de TatC (Zoufaly *et al.*, 2012). Il a été proposé que plusieurs copies de la protéine TatB enveloppent la molécule du substrat (Maurer *et al.*, 2010). Le complexe TatBC avec le substrat a été isolé chez *E. coli* et sa structure a été caractérisée par la microscopie électronique (Tarry *et al.*, 2009).

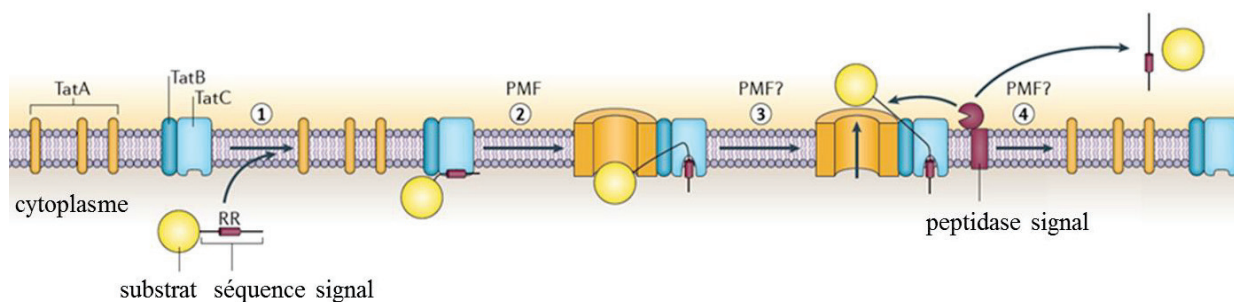


Figure 14. Modèle de translocation par le système Tat chez *E. coli* et dans les chloroplastes.

1. Reconnaissance de séquence signal du substrat par le complexe TatBC. 2. Association de monomères de TatA autour du complexe membranaire TatBC. 3. Transportation du substrat à travers la membrane interne dans le périplasme. 4. Clivage de la séquence signal par la signal peptidase spécifique (Palmer & Berks, 2003).

Bien que le complexe TatBC contienne plusieurs copies de TatC et plusieurs sites de fixation de séquence signal, pour le moment, il n'a été démontré que la fixation d'une ou deux molécules du substrat en même temps.

L'interaction entre le complexe TatBC et le substrat stimule l'association des monomères de TatA autour du complexe membranaire TatBC. Cette interaction est dépendante de la force proton motrice (Figure 14, 2) (Alami *et al.*, 2003 ; Mori & Cline, 2002). Pendant la translocation, le substrat se trouve probablement en interaction simultanée avec les trois protéines Tat (Gerard & Cline, 2007 ; Mori & Cline, 2002). Une autre hypothèse soutient que le substrat pourrait être transféré de TatBC à TatA (Panahandeh *et al.*, 2008). Les études du système Tat des thylakoïdes ont démontré que la polymérisation de TatA est stimulée par l'interaction avec le complexe TatBC-substrat (Dabney-Smith & Cline, 2009). Ces données ont été confirmées par les études réalisées chez *E. coli* en utilisant TatA fusionnée avec YFP (yellow fluorescent protein). La protéine TatA seule peut former un tétramère. Par contre, en présence du complexe TatBC-substrat, TatA forme un grand complexe composé de 25 sous-unités (Leake *et al.*, 2008).

Une étude structurale de TatA de *B. subtilis*, réalisée par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire, a permis de confirmer la fiabilité des prédictions précédentes (Beck *et al.*, 2013). Notamment, TatA possède une hélice transmembranaire (TMH) à l'extrémité N-terminale suivi d'une partie amphipathique (APH) et une extrémité C-terminale, non structurée et fortement chargée (Porcelli *et al.*, 2002). L'extrémité C-terminale n'est pas essentielle à la fonction de TatA (Lee *et al.*, 2002 ; Dabney-Smith *et al.*, 2009). TatA est pliée autour d'un résidu de glycine conservé qui est située dans le linker entre TMH et APH, et qui permet un positionnement approprié de ces hélices. La protéine TatB semble avoir le même type de structure que TatA, tout en étant considérablement plus longue.

Lorsque TatA a été extraite de la membrane cytoplasmique à l'aide d'un détergent doux, cette protéine se trouve sous une forme d'oligomères d'une taille variée (Gohlke *et al.*, 2005 ; Oates *et al.*, 2005). L'analyse par microscopie électronique a montré que ces oligomères ont une structure circulaire avec une densité qui occupe la cavité centrale. Le taux d'oligomérisation de TatA dans la solution est dépendant de l'interaction spécifique entre ses hélices transmembranaires (Gohlke *et al.*, 2005).

Après l'assemblage du complexe TatABC-substrat, le substrat va être transporté à travers la membrane interne dans le périplasme, où la séquence signal va être clivée par la signal peptidase spécifique (Figure 14, 3) (Luke *et al.*, 2009), suivie de la dissociation du complexe TatABC (Cline & McCaffery 2007 ; Mori & Cline, 2002). L'extrémité C-terminale de la séquence signal doit atteindre le côté périplasmique de la membrane pour être clivé (Figure 14, 4) (Paetzel *et al.*, 1998). Le destin de la séquence signal après son clivage n'est pas clair. La location transmembranaire de la séquence signal non clivable de la protéine Rieske suppose que ce peptide peut être libéré du complexe TatABC dans la bicouche lipidique. Pourtant, l'adressage de la protéine PnIH de *Dickeya dadantii* dans la membrane externe est aussi guidé par la présence de la séquence signal Tat non clivable (Ferrandez & Condemine, 2008). Ceci montre que la séquence signal peut être relâchée sur le côté périplasmique de la membrane interne.

Les systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram négatif.

Une des tâches importantes des cellules bactériennes consiste à localiser correctement diverses protéines pour assurer leur fonctionnement correct. L'adressage des protéines bactériennes a été longtemps pensé comme un processus moins compliqué que celui dans les cellules eucaryotes, qui possèdent plusieurs compartiments (Filloux, 2010b). En général, le principe est le suivant : la protéine possède une « étiquette » qui porte l'information sur son adressage jusqu'à la destination finale. Cependant, il existe de multiples exemples beaucoup plus complexes. De plus, si chez les bactéries à Gram positif, les protéines extra-cytoplasmiques peuvent être insérées dans la membrane cytoplasmique ou être sécrétées dans le milieu extracellulaire, ce choix est beaucoup plus complexe chez les bactéries à Gram négatif. Des protéines peuvent être dirigées dans la membrane cytoplasmique (interne), le périplasme, la membrane externe ou être sécrétées dans le milieu extracellulaire ou encore directement dans la cellule d'hôte. Ce large choix de destinations finales contraint des bactéries à Gram négatif à développer plusieurs systèmes de sécrétion. A l'heure actuelle, six systèmes de sécrétion ont été mis en évidence chez les bactéries à Gram négatif (Figure15) (Tseng *et al.*, 2009). Ils assurent la sécrétion de divers substrats et possèdent des mécanismes très variés d'assemblage, de fonctionnement et de reconnaissance des substrats.

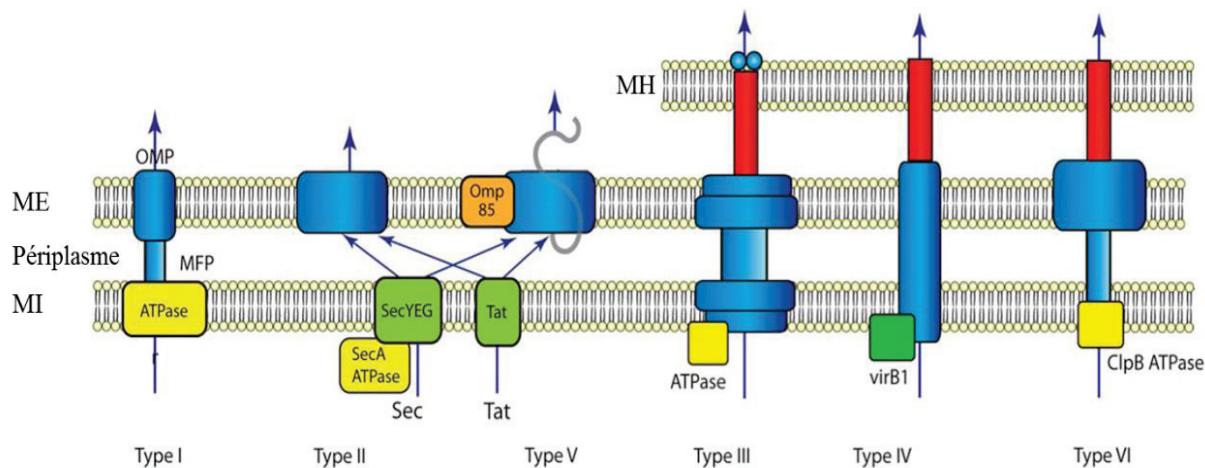


Figure 15. Six systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram négatif.

MI : la membrane interne, ME : la membrane externe, MH : la membrane d'hôte (Tseng *et al.*, 2009).

Ces systèmes vont être présentés dans les chapitres suivants en portant une attention particulière aux mécanismes de reconnaissance des substrats.

III. Le système de sécrétion de type I (T1SS).

III.1. Introduction

Le système de sécrétion type I fait partie de la famille des transporteurs ABC (ATP binding cassette), impliqués dans l'exportation ou l'importation de différents substrats à travers la membrane. Le T1SS est largement répandu chez les bactéries à Gram négatif, où il assure la sécrétion des protéines sous une forme non repliée en une seule étape, du cytoplasme vers le milieu extracellulaire.

Les substrats du T1SS sont très variables au niveau de leur taille : de 5,8 kDa pour la colicine V à 900 kDa pour certaines protéines RTX (repeats-in-toxins). En général, ce sont des protéines acides avec un pI voisinant de 4. La majorité d'entre elles contiennent peu ou pas de cystéines. Ce sont des hydrolases (protéases, lipases, nucléases, phosphatases, glycanases), des toxines (par exemple, la toxine HlyA d'*E. coli*) ou des hémophores (par exemple, HasA de *Serratia marcescens*). Chez *D. dadantii* quatre métalloprotéases, PrtA, B, C et G sont sécrétées par le T1SS (Ghigo & Wandersman, 1992). La sécrétion des substrats de T1SS est indépendante du système Sec. Les séquences signal qui permettent la sécrétion par T1SS sont localisées à l'extrémité N-terminale des bactériocines et colicines ou à l'extrémité C-terminale des autres substrats (Kanonenberg *et al.*, 2013).

La première protéine pour laquelle la sécrétion par le T1SS a été démontrée était l'hémolysine HlyA (Welch *et al.*, 1981). L'hémolysine HlyA est une protéine de la famille RTX (Linhartova *et al.*, 2010). Le système Hly est composé d'un transporteur ABC (la protéine HlyB),

d'une protéine MFP (membrane fusion protein, la protéine HlyD) et de la protéine OMP (outer membrane protein, TolC) (Holland *et al.*, 2005) (Figure 16).

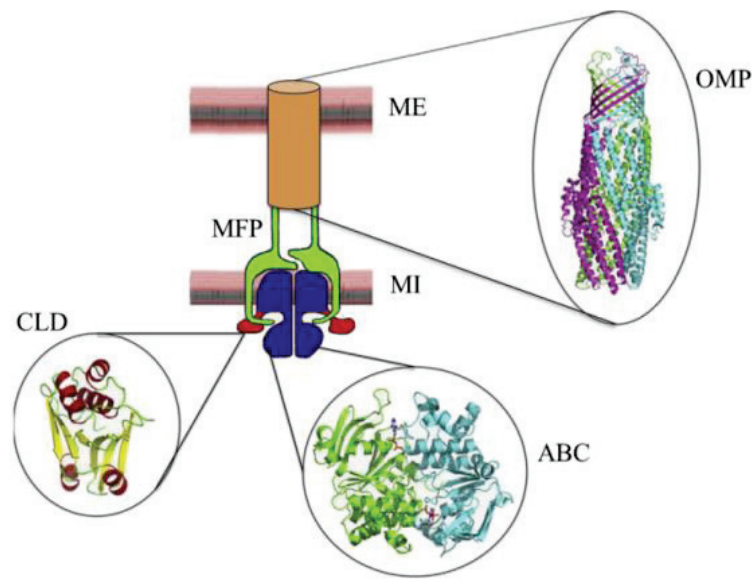


Figure 16. Modèle du T1SS impliqué dans la sécrétion de la protéine HlyA (Kanonenberg *et al.*, 2013). Le transporteur ABC est représenté en bleu (avec son domaine CLD en rouge), la protéine MFP est en vert et la protéine OMP est en orange. Les structures secondaires sont présentées pour le transporteur ABC, HlyB (1XEF, Zaitseva *et al.*, 2005), le domaine CLD de HlyB (3ZUA, Lecher *et al.*, 2012) et la protéine TolC (1EK9, Koronakis *et al.*, 2000).

Outre son rôle de connecteur, la protéine MFP semble être impliquée dans la reconnaissance du substrat grâce à sa partie N-terminale située dans le cytoplasme (Figure 16). La délétion de cette partie de la protéine HlyD affecte la sécrétion de l'hémolysine HlyA (Balakrishnan *et al.*, 2001). De plus, il a été démontré que le recrutement de la protéine OMP se produit seulement après l'interaction du substrat avec les deux protéines de la membrane interne : MFP et le transporteur ABC (Figure 16).

III.2. Le transporteur ABC joue le rôle principal dans le T1SS.

Le transporteur ABC joue un rôle de moteur de la sécrétion, il est également impliqué dans la reconnaissance du substrat. La structure du transporteur ABC consiste en deux domaines transmembranaires (TMD) et deux domaines de liaison au nucléotide (nucleotide binding domain, NBD) (Davidson *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2009).

Le domaine de liaison au nucléotide NBD est composé de motifs conservés : un motif Walker A et Walker B, les boucles C, Q, D et H et boucle à la proline, nécessaires à l'hydrolyse de l'ATP (Higgins & Linton, 2004). Les domaines transmembranaires sont des régions variables. Ceci est lié à leur rôle dans la reconnaissance du substrat.

Les transporteurs ABC forment des dimères fonctionnels (Fetsch & Davidson, 2002; Zaitseva *et al.*, 2005). La fixation de l'ATP provoque un changement conformationnel : en l'absence de l'ATP les deux NBDs sont ouverts, tandis qu'ils se ferment suite à la fixation de l'ATP et forment un dimère compact (Hollenstein *et al.*, 2007).

Tous les transporteurs ABC impliqués dans la sécrétion par T1SS sont composés de deux TMDs et deux NBDs. Par contre, la plupart d'entre eux possèdent à l'extrémité N-terminale des domaines supplémentaires cytoplasmiques. Cette variabilité de la partie N-terminale a permis de classer les transporteurs ABC en trois groupes (Kanonenberg *et al.*, 2013). Cette classification est cohérente avec le type du signal de sécrétion. Le premier groupe contient les transporteurs ABC de type peptidase C39 qui sont impliqués dans la reconnaissance de la séquence signal située à l'extrémité N-terminale des substrats. Le deuxième groupe est représenté par les transporteurs ABC portant les domaines CLD connus pour leur interaction avec l'extrémité C-terminale des substrats. Enfin, le troisième groupe réunit les transporteurs ABC sans aucun domaine supplémentaire.

III.2.1. Les transporteurs ABC possédant les domaines de type peptidase C39.

Les substrats sécrétés par ce groupe du T1SS possèdent une séquence signal clivable à l'extrémité N-terminale. Ce type de système est impliqué dans le transport des petites bactériocines et microcines (Duquesne *et al.*, 2007). Premièrement, ce type de transport a été décrit chez les bactéries à Gram positif, car la sécrétion des petits peptides antimicrobiens n'est pas fréquente chez les bactéries à Gram négatif. Les microcines d'une taille inférieure à 10 kDa représentent les plus petits substrats sécrétés par le T1SS (Duquesne *et al.*, 2007). Les transporteurs ABC qui sont impliqués dans la sécrétion des microcines contiennent un domaine supplémentaire à l'extrémité N-terminale avec une activité protéolytique dépendante du calcium (Wu & Tai, 2004). Comme ce domaine protéolytique possède une structure et une séquence similaires à celles de la peptidase C39, il a été appelé domaine C39 (Havarstein *et al.*, 1995). La peptidase C39 est responsable du clivage de la séquence signal N-terminale vers son extrémité C-terminale où est situé un motif double glycines. Après le clivage réalisé pendant l'interaction entre la séquence signal avec le transporteur ABC, le substrat sera sécrété par le T1SS (Duquesne *et al.*, 2007).

Le substrat le mieux caractérisé de ce type de T1SS est la colicine V ou MccV d'*E. coli* (Jeziorowski *et al.*, 2007). Le domaine C39 possède le site actif composé de trois résidus conservés : histidine, cystéine et l'acide aspartique qui sont essentiels pour l'activité protéolytique et la sécrétion (Wu & Tai, 2004). D'autres études ont confirmé le rôle majeur de ce domaine, car il est indispensable au clivage de la séquence signal et à l'activité du transporteur ABC. Le rôle exact de la séquence signal N-terminale de ce type de T1SS n'a pas été identifié. Cependant, il a été proposé

que l'interaction entre la séquence signal et le domaine C39 permette de garder le substrat dans sa forme non repliée pendant la sécrétion (Duquesne *et al.*, 2007).

III.2.2. T1SS avec les transporteurs ABC possédant un domaine CLD.

Dans certains T1SS, le transporteur ABC possède à l'extrémité N-terminale un domaine de structure similaire à celle du domaine C39 (Ishii *et al.*, 2010). Par contre, ce domaine ne possède pas d'activité protéolytique à cause de l'absence de la cystéine dans son site actif (Lecher *et al.*, 2012). Il a été appelé CLD (C39-like domain). Les substrats sécrétés par ce type de T1SS ne possèdent pas une séquence signal à l'extrémité N-terminale. Par contre, il a été démontré que la présence d'un domaine CLD est essentielle pour la sécrétion de l'hémolysine HlyA et que le domaine CLD isolé est capable d'interagir avec le fragment C-terminal de HlyA (Lecher *et al.*, 2012).

Le signal permettant la sécrétion par ce type de T1SS est localisé à l'extrémité C-terminale des protéines et il est non clivable (Delepelaire, 2004). De plus, les substrats de T1SS contiennent souvent plusieurs motifs RTX (repeats-in-toxins). Ces motifs sont des régions riches en glycine et acide aspartique $^N\text{GGXGDXUX}^C$, où U représente un grand résidu hydrophobe (Welch, 2001). Ces motifs RTX représentent des sites de liaison au calcium et ils jouent un rôle important dans le repliement des protéines RTX. Ces protéines ne peuvent pas se replier dans le cytoplasme, où la concentration en calcium est basse. Plusieurs protéines sécrétées par le T1SS possèdent jusqu'aux 50 motifs RTX par protéine, qui forment une structure riche en brins- β . Plusieurs études ont démontré l'importance de ces régions pour l'activité des protéines sécrétées. Un modèle de sécrétion par le T1SS a été proposé pour les protéines RTX (Figure 17).

Le transporteur ABC et la protéine MFP forment un complexe dans la membrane interne en l'absence du substrat (étape 1). La séquence signal localisée à l'extrémité C-terminale interagit avec les domaines NBD du transporteur ABC et/ou avec la protéine MFP ; ceci provoque le recrutement de la protéine OMP et la formation d'un canal à travers du périplasme (étape 2). Le substrat est sécrété sous une forme non repliée, ce qui a été récemment confirmé (Bakkes *et al.*, 2010) (étape 3). Repliement du substrat avec l'assistance du calcium dans le milieu extracellulaire et restauration du système (étape 4).

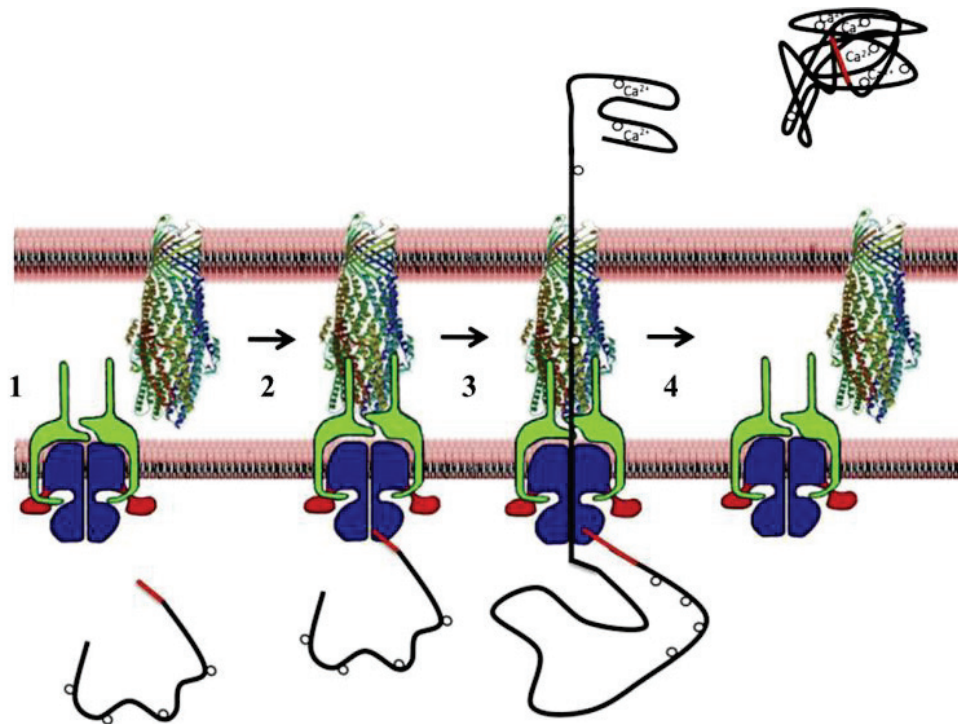


Figure 17. Modèle de sécrétion par le T1SS pour les protéines RTX.

Le code couleur est le même que dans le Figure 16. Le substrat est représenté en noir sous une forme non repliée dans le cytoplasme, la séquence signal est marquée en rouge et le site de fixation du calcium avec les motifs RTX sont représentés avec les cercles (Kanonenberg *et al.*, 2013).

III.2.3. T1SS avec les transporteurs ABC sans aucun domaine supplémentaire.

Dans certains T1SS, le transporteur ABC ne possèdent aucun domaine supplémentaire. Leurs substrats peuvent contenir des motifs RTX, mais ils ne possèdent pas une séquence signal N-terminale clivable. La majorité de ces substrats sont de petite taille et possèdent une activité hydrolytique, par exemple, des protéases ou des lipases (Delepelaire, 2004 ; Holland *et al.*, 2005). Le substrat de ce type de T1SS le mieux caractérisé est probablement l'hémophore HasA, sécrétée par *S. marcescens* dans les conditions d'une basse concentration en fer (Holland *et al.*, 2005 ; Masi & Wandersman, 2010). La protéine HasA ne contient pas de motif RTX. Cependant, le mécanisme de sa reconnaissance est proche de celui des protéines RTX, car la séquence reconnue par le transporteur ABC est localisée à l'extrémité C-terminale de HasA (Delepelaire, 2004). De plus, il a été démontré que HasA contient des motifs appelés "primary anchor sites" qui sont nécessaires à l'interaction avec le transporteur ABC et à la sécrétion. Ces données ont permis de proposer un mécanisme de sécrétion de HasA par le T1SS (Masi & Wandersman, 2010) (Figure 18).

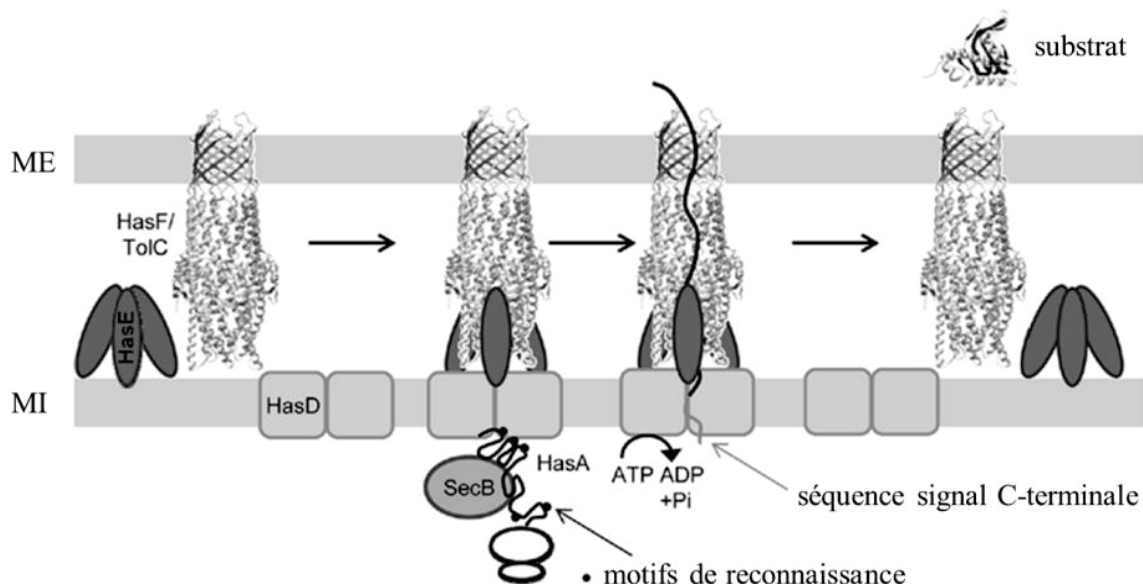


Figure 18. Modèle de sécrétion de HasA par le T1SS.

Le substrat interagit avec le chaperon SecB, ce qui permet l'exposition des motifs de reconnaissance qui vont être reconnus par le transporteur ABC, HasD (Masi & Wandersman, 2010).

La protéine HasA contient des motifs supplémentaires permettant sa reconnaissance par le système Has. Il a été démontré que la sécrétion de HasA est dépendante de la présence d'un chaperon général SecB (Masi & Wandersman, 2010). Ce chaperon interagit avec la partie N-terminale de la protéine HasA et empêche son repliement dans le cytoplasme, car il a été démontré que les substrats du T1SS sont sécrétés sous une forme non repliée (Sapriel *et al.*, 2002). En l'absence du chaperon SecB, la sécrétion de HasA est arrêtée (Sapriel *et al.*, 2003 ; Wolff *et al.*, 2003). Dans le cas des protéines RTX c'est une faible concentration en calcium qui joue le rôle principal pour éviter le repliement des substrats dans le cytoplasme. Par contre, la protéine HasA se replie très vite dans le cytoplasme en l'absence de SecB ce qui n'est pas compatible avec la sécrétion (Debarbieux & Wandersman, 2001). Il a été suggéré que les domaines supplémentaires situés à l'extrémité N-terminale du transporteur ABC peuvent agir comme des chaperons en interagissant avec leurs substrats.

On ne dispose que de peu de données sur la structure de la séquence C-terminale des protéines sécrétées par le T1SS. Il a été démontrée qu'une telle séquence isolée est capable de former une hélice- α (Kanonenberg *et al.*, 2013). La séquence C-terminale de l'hémolysine peut être remplacée par une séquence équivalente de certaines autres protéines de la famille RTX, même si le degré de leur homologie de séquence est très bas. Ceci confirme l'hypothèse que le signal de sécrétion de T1SS est d'une nature structurale. Le signal de sécrétion d'hémolysine HlyA est constitué de deux hélices- α séparées par un linker et suivies d'une région non structurée à l'extrémité C-terminale.

La première hélice- α a un caractère amphiphile et est essentielle pour la sécrétion, tandis que la deuxième peut être remplacée par un linker de quatre à sept résidus (Delepelaire, 2004).

L'extrémité C-terminale des protéases, de l'hémophore HasA et des lipases possède plus de conservation. Toutes les séquences C-terminales des protéases possèdent un acide aminé chargé négativement suivi par trois résidus hydrophobes. Même un seul résidu ajouté dans cette région peut affecter la sécrétion. Par exemple, l'ajout d'un résidu du tryptophane à l'extrémité C-terminale de métalloprotéase PrtG de *D. dadantii* diminue le niveau de sa sécrétion à 50 %, et la substitution d'un de résidus chargés par la phénylalanine arrête complètement la sécrétion (Ghigo & Wandersman, 1994).

En général, le signal de sécrétion de T1SS serait donc constitué d'une séquence non clivable, située à l'extrémité C-terminale du substrat. Cette région de 30 à 60 résidus n'est pas conservée au niveau de séquence en acides aminés mais elle possède une structure secondaire conservée. De plus, cette séquence ne peut pas être enlevée sans perte de sécrétion (Zhang *et al.*, 1995). Les études réalisées plus récemment ont démontré que la protéine HasA peut être adressée vers le transporteur ABC même en absence de 14 résidus situés à l'extrémité C-terminale (Cescau *et al.*, 2007). Cependant, l'absence de cette région provoque un arrêt de sécrétion, ceci suggère que l'extrémité C-terminale de substrat joue un rôle important pendant l'étape de libération de substrat et de réinitialisation de la sécrétion.

Il a été démontré que les domaines NBD du transporteur ABC HlyB interagissent spécifiquement avec l'extrémité C-terminale de la protéine sécrétée, HlyA (Benabdelhak *et al.*, 2007). Ces données corroborent une étude précédente dans laquelle la protéine hybride portant la partie N-terminale de la protéine AprA de *P. aeruginosa* et la partie C-terminale de HlyA d'*E. coli* a été dirigée vers le transporteur HlyB mais pas à AprB (Duong *et al.*, 1996). Ceci confirme une connexion et une dépendance entre les transporteurs ABC et les substrats de T1SS.

En conclusion, le motif de sécrétion des protéines sécrétées par T1SS peut être présenté soit par une séquence localisée à l'extrémité N-terminale (bactériocines et colicines), soit par une séquence non-clivable C-terminale. Le rôle principal de la reconnaissance de protéines est attribué aux domaines N-terminaux de transporteurs ABC.

IV. Le système de sécrétion de type III (T3SS).

IV.1. Introduction.

Au moins 25 % des espèces de bactéries à Gram négatif, pathogènes et symbiotiques utilisent un appareil de sécrétion de type III pour injecter des effecteurs directement dans le cytoplasme de la cellule eucaryote cible (Worrall *et al.*, 2010). Ce système est largement répandu chez les pathogènes d'animaux *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Salmonella* et les souches pathogènes d'*E. coli* (Cornelis, 2006).

Le T3SS, appelée aussi injectisome, forme un complexe multiprotéique qui traverse les deux membranes bactériennes et la membrane de la cellule de l'hôte (Figure 19). Ceci permet la sécrétion des substrats en une seule étape, directement dans le cytoplasme de cellules de l'hôte. Les protéines secrétées par le T3SS, appelées effecteurs, sont très nombreuses et variées. Les pathogènes d'animaux équipés d'un T3SS secrètent entre quatre et douze effecteurs qui affectent la signalisation dans les cellules eucaryote et déstabilisent la réponse de défense (Moraes *et al.*, 2008; Worrall *et al.*, 2010).

Chez les pathogènes de plantes (*P. syringae*, *Erwinia amylovora*, *X. campestris*, *Ralstonia solanacearum*) les effecteurs secrétés par T3SS peuvent à la fois provoquer des réponses d'hypersensibilité (HR, interaction incompatible) sur des plantes non-hôtes et des plantes hôtes résistantes ainsi que la maladie sur des plantes hôtes sensibles (interaction compatible). Les effecteurs peuvent affecter la signalisation en réprimant la réponse de défense ; certains effecteurs possèdent une activité de protéase à cystéine ou phosphatase à tyrosine (Moraes *et al.*, 2008; Worrall *et al.*, 2010). Les gènes codant les effecteurs et les composants du T3SS sont souvent regroupés au même endroit dans le génome des bactéries : ce sont des îlots de pathogénicité, appelés clusters *hrp* chez les pathogènes des plantes. Le nombre d'effecteurs peut varier d'un pathogène à l'autre : près d'une quarantaine a été identifiée chez les divers pathovars de *P. syringae* tandis qu'*E. amylovora* n'en possède qu'une dizaine.

Des études génétiques ont démontré une forte similarité du T3SS avec l'appareil flagellaire chez les bactéries à Gram négatif. Cette similarité est conservée au niveau structural et fonctionnel (Erhardt *et al.*, 2010). Les T3SSs sont organisés en 7 familles différentes. Chez les pathogènes des plantes deux types de T3SS sont présents, les familles Hrp1 et Hrp2 (Cornelis, 2006). Souvent, la même bactérie possède deux systèmes de type III appartenant à deux familles différentes, où chaque système accomplit un rôle spécifique pendant l'infection (Yip & Strynadka, 2006). En général, le T3SS est composé d'une vingtaine de protéines différentes, mais seule neuf d'entre elles sont bien conservées chez tous les systèmes (Cornelis,

2006). Les composants du T3SS sont organisés en trois complexes : 1) le corps basal 2) une structure creuse qui ressemble à une aiguille et 3) le translocon (Izoré *et al.*, 2011; Matteï *et al.*, 2011) (Figure 19). L'assemblage du système commence par la formation du corps basal, suivi par l'assemblage des structures en anneaux dans les membranes interne et externe (Figure 19, étape 1) (Diepold *et al.*, 2010). Ensuite, une structure en aiguille va être assemblée pour arriver jusqu'à la membrane de la cellule hôte (Figure 19, étape 2 et 3). Enfin, le translocon, un complexe protéique creux, va être formé dans la membrane de la cellule de l'hôte et les effecteurs vont être transportés à travers ce pore dans le cytoplasme de la cellule hôte (Figure 19, étape 4).

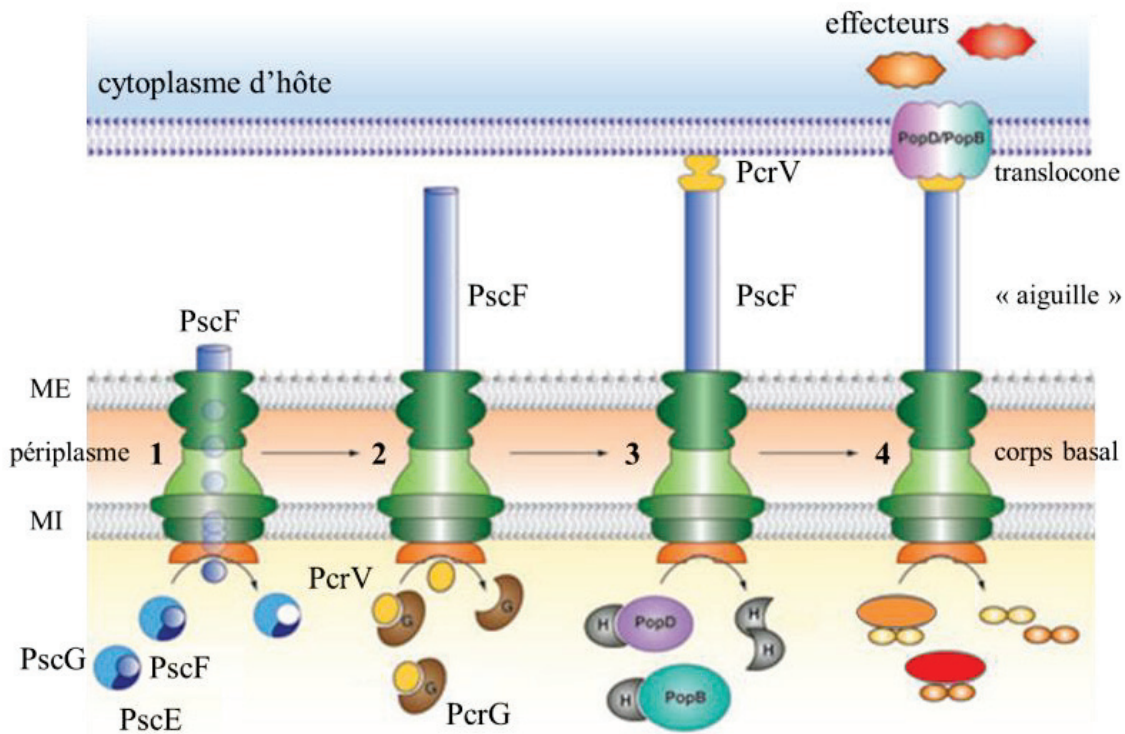


Figure 19. Représentation schématique d'assemblage du T3SS de *P. aeruginosa*.

1) Après la formation du corps basal (en vert) la protéine PscF (en bleu) se dissocie de ses chaperons (PscG et PscE), passe au travers du corps basal et se polymérise pour former une « aiguille ». 2) PcrV (en jaune) se dissocie de son chaperon cytoplasmique PcrG (en marron) et forme le sommet de l'« aiguille ». 3) Les protéines du translocon PopB (en bleu clair) et PopD (en violet) se dissocient de la protéine PcrH (en gris). 4) Après la formation du pore de translocon dans la membrane de la cellule d'hôte, les effecteurs se dissocient de leur chaperon cytoplasmique et vont être transportés à travers le canal de l'« aiguille » directement dans le cytoplasme d'hôte (Diepold *et al.*, 2010).

Les études structurales réalisées à l'aide de microscopie électronique ont permis de décrire en détail le corps basal du T3SS de *Shigella* et *Salmonella*. Il est composé de trois protéines conservées, qui sont organisées en anneaux (Schraidt & Marlovits, 2011) (Figure 20). Deux de ces protéines sont situées dans la membrane interne et la troisième, la sécrétine, se trouve dans la

membrane externe. La sécrétine de T3SS possède une forte similarité avec les sécrétines des autres systèmes, comme le système de sécrétion de type II (T2SS) et le système de pili type IV (T4P). La partie du corps basal située dans la membrane externe est connectée à celle de la membrane interne par une région de la sécrétine en forme d'un « cou ». A l'intérieur, le corps basal est connecté avec les protéines de la membrane interne par une structure en forme de « tasse » qui est orientée vers le cytoplasme. Il est concevable que les protéines à sécréter sous une forme dépliée soit délivrées dans cette cavité de la « tasse » avant d'être chargées dans la cavité de l' « aiguille » (Hayes *et al.*, 2010) (Figure 20).

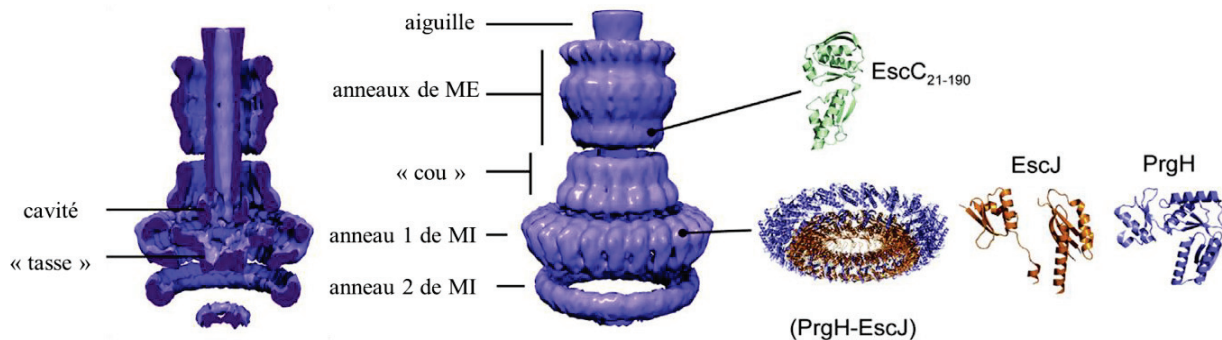


Figure 20. Complexe du corps basal du T3SS de *S. typhimurium*.

Reconstitution 3D obtenue par cryo-microscopie électronique. Les structures cristallines des domaines périplasmique des protéines EscC (en vert, 3GR5), PrgH (en violet, 3GR0) et EscJ (en orange, 1YJ7) ; et les anneaux formés par EscJ et PrgH sont également présentés, leurs positions sont indiquées avec les flèches sur la structure 3D (Tosi *et al.*, 2013).

IV.2. Le rôle de chaperons dans la sécrétion par le T3SS.

L'assemblage et la sécrétion de substrats du T3SS nécessite la participation de chaperons spécifiques. Les chaperons de T3SS ne possèdent pas d'activité enzymatique ATPasique, ils se fixent sur les substrats et empêchent ainsi le repliement d'une partie de la protéine. Les chaperons du T3SS ne sont jamais sécrétés à l'extérieur du cytoplasme. En effet, les études de co-cristallisation et de l'interaction en solution réalisées par RMN ont démontré que les chaperons de T3SS se fixent sur les protéines, les maintiennent dans un état partiellement déplié (Stebbins *et al.*, 2001 ; Rodgers *et al.*, 2010). Une classification des chaperons a été proposée (Cornelis, 2006) : les chaperons de classe I qui interagissent avec les effecteurs sécrétés par le T3SS, les chaperons de classe II se fixent sur les protéines du translocon et les chaperons de classe III liées aux protéines de l' « aiguille ».

IV.2.1. Les chaperons de Classe I : les protecteurs de substrats de T3SS.

Généralement, les effecteurs sécrétés par le T3SS sont dépendantes de la présence de chaperons de Classe I. Les chaperons de classe I sont des petites protéines (de 15 à 20 kDa)

acides (pI ~4-5), qui sont actives sous une forme dimérique. Ce type de chaperons interagit avec la protéine partenaire par le domaine de liaison au chaperon (CBD, chaperone-binding domain) localisé dans la région N-terminale des effecteurs. Les chaperons de classe I peuvent être divisés en deux sous-classes, IA et IB. Les chaperons de classe IA interagissent avec un seul effecteur et leur gène sont situés à côté du gène de leur effecteur. Les chaperons de classe IB interagissent avec plusieurs effecteurs et leur gène sont situés proche de l'opéron de T3SS.

Même si les chaperons de cette classe ne partagent pas une forte similarité de séquence, ils possèdent le même type de la structure tridimensionnelle. Le chaperon InvB comporte cinq brins β et trois hélices α . Le domaine CBD des effecteurs entoure le chaperon dimérique, et ils forment ensemble une structure composée d'hélices α (Figure 21). Les résidus hydrophobes situés sur l'interface formé par la dimérisation du chaperon sont impliqués dans l'interaction avec la protéine-effecteur.

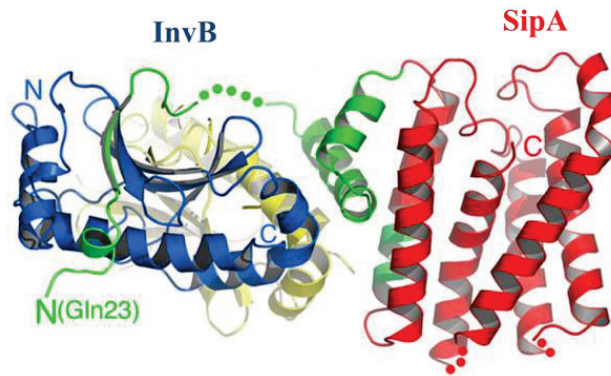


Figure 21. Structure cristalline du complexe SipA-InvB.

Deux monomères du chaperon InvB sont présentés en bleu et jaune. La protéine SipA est présentée en rouge avec la région qui interagit avec le chaperon en vert.

Même si certains chaperons de T3SS ont été caractérisés plus en détails, leur fonction est encore discutable. Certaines études ont démontré que les chaperons peuvent participer à l'adressage des effecteurs et les présenter au système. Les autres travaux soutiennent que le rôle principal des chaperons est de garder les substrats de T3SS dans un état compatible avec la sécrétion. Il a été proposé que le chaperon de la protéine SycE peut porter un signal tridimensionnel qui va être reconnu par les composants du T3SS (Birtalan *et al.*, 2002). Les chaperons peuvent également faciliter la présentation de fragments situés à côté du domaine CBD. Il a été démontré que chez *S. typhimurium*, le chaperon empêche la sécrétion des effecteurs par le système de l'assemblage de flagelle à la place de l'injectisome (Lee & Galan, 2004). Cette hypothèse est cohérente avec le modèle d'interaction du substrat avec l'ATPase du T3SS. L'ATPase enlève le chaperon du site d'interaction avec l'effecteur

avant sa sécrétion. Il a été démontré que les ATPases ont évolué pour pouvoir reconnaître des chaperons. Enfin, certains chaperons de classe I sous forme libre jouent un rôle dans la régulation de la synthèse des effecteurs (Akeda & Galán, 2005).

IV.2.2. Les chaperons de Classe II.

Les protéines hydrophobes sont souvent toxiques pour la cellule bactérienne et les chaperons de Classe II accomplissent un rôle de neutralisation de cette toxicité (Wilharm *et al.*, 2006). Par exemple, le chaperon SycD interagit avec les protéines YopBD chez *Yersinia*. Le chaperon IpgC a la même fonction vis-à-vis d'IpaBC chez *Shigella* et SicA, vis-à-vis de SipBC chez *Salmonella typhimurium*. De plus, pour SicA, un rôle de régulation de la synthèse des effecteurs a été décrit (Page & Parsot, 2002).

Les chaperons de classe II interagissent avec la région N-terminale des protéines du translocon (Adam *et al.*, 2012). La structure de ce complexe a été obtenue grâce à la co-cristallisation de chaperons avec les peptides issus du domaine de liaison au chaperon (Figure 22). Ces chaperons forment un homodimère composé d'hélices- α antiparallèles. Dans la structure du complexe IpgC-IpaB de *Shigella*, le chaperon IpgC forme un dimère avec une cavité d'environ 10 Å dans laquelle le peptide de la protéine IpaB est fixé (Lunelli *et al.*, 2009). Les 32 résidus N-terminaux d'IpgC sont indispensables pour la dimérisation. Il en est de même pour les régions N-terminales des chaperons SicA de *Salmonella* et SycD d'*Yersinia*. Par ailleurs, les substitutions dans la région N-terminale d'IpgC affectent le niveau de la sécrétion des effecteurs (Lunelli *et al.*, 2009).

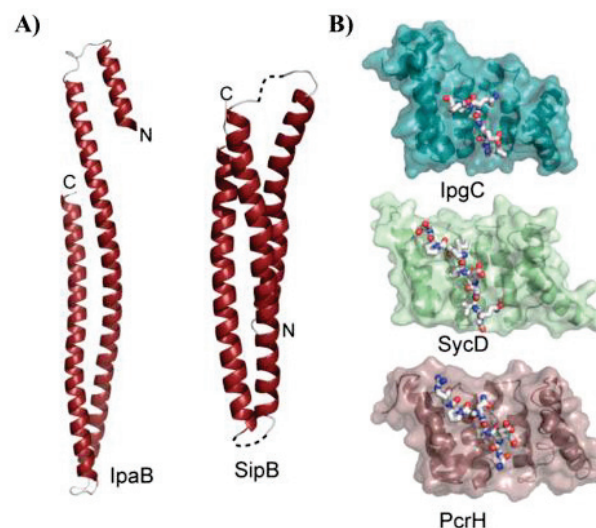


Figure 22. Structures de domaines N-terminaux de protéines du translocon et des chaperons.

A) Les domaines N-terminaux de protéines IpaB de *Shigella* et SipB de *Salmonella* B) Les chaperons IpgC, SycD et PcrH avec les peptides du domaine de liaison au chaperon. (Lunelli *et al.*, 2009).

IV.2.3. Les chaperons de classe III.

Les chaperons de classe III interagissent avec les sous-unités de l'« aiguille » empêchant ainsi leur polymérisation précoce dans le cytoplasme. De plus ces chaperons assistent la reconnaissance des composants de l'injectisome et assurent leur adressage vers le pore de translocation. Par exemple, PscF, le composant de l'« aiguille » de *P. aeruginosa*, interagit avec deux chaperons cytoplasmiques, PscE et PscG (Figure 23A). Les mêmes évènements ont été décrits chez *Yersinia*, avec la protéine YscF et le couple YscE/YscG (Figure 23B).

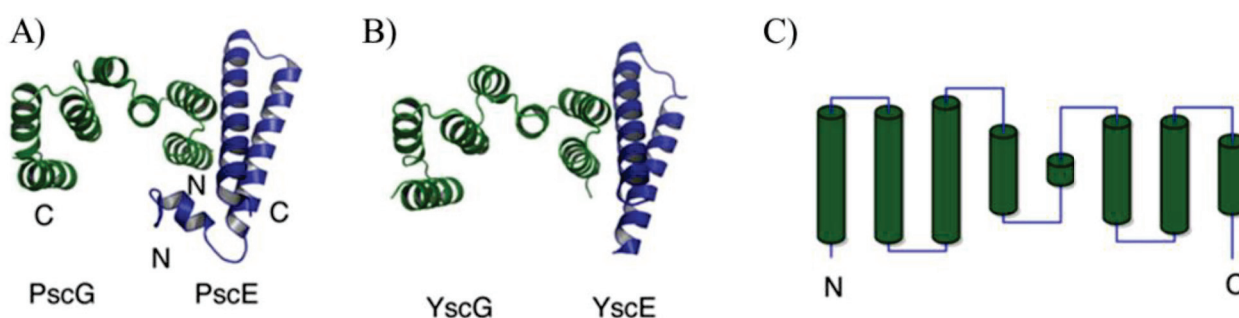


Figure 23. Structures de chaperons de classe III.

A) Les protéines chaperons PscE et PscG de *P. aeruginosa*. B) Les chaperons YscG et YscE d'*Yersinia*. C) Topologie de chaperons.

IV.3. Les effecteurs sécrétés par le T3SS.

Le T3SS assure la translocation de nombreux effecteurs très variés dans les cellules de l'hôte. Après la translocation dans le cytosol d'une cellule de l'hôte, plusieurs effecteurs vont mimer la structure et/ou la fonction de protéines eucaryotes dans le but de perturber la signalisation. Ceci joue un rôle important dans la colonisation, l'invasion, la survie et la virulence de pathogènes portants un T3SS (Cornelis, 2006).

Chez les pathogènes des plantes, le T3SS sécrète des substrats appelées protéines d'avirulence Avr et effecteurs du type Hrp (**H**ypersensitive **R**esponse **P**roteins). Ces protéines peuvent être reconnues par des protéines de résistance de la plante hôte, codées elles-mêmes par des gènes de résistance ou R. Cette reconnaissance est spécifique, c'est-à-dire qu'une protéine R ne pourrait reconnaître qu'un type de protéine Avr, et elle aboutit à une réaction de résistance générale qui se traduit par la mort cellulaire au point d'infection, rendant impossible la progression du pathogène. Cette réaction est appelée la réaction d'hypersensibilité (HR, **H**ypersensitive **R**esponse). L'interaction protéine R-Avr peut se faire directement, par contact entre les deux protéines ou grâce à la reconnaissance indirecte de conséquences de l'activité de la protéine Avr (Coll *et al.*, 2011). Les effecteurs Hrp sont les initiateurs du dialogue moléculaire qui s'établit

entre la plante et la bactérie. Leur rôle est de pouvoir créer une situation de compatibilité qui permettra au pathogène de se multiplier, comme, par exemple, provoquer une nécrose cellulaire pour assurer une disponibilité en nutriments relâchés des cellules hôtes. À l'origine, avant l'apparition des gènes majeurs de résistance R, le rôle des premiers effecteurs Hrp était vraisemblablement de supprimer les défenses dites "basales" de la plante comme la production de composés antimicrobiens de type phytoalexines. Avec l'apparition des gènes de résistance, les bactéries phytopathogènes ont dû faire face à une nouvelle barrière de défense très efficace (PR-protéines, mort cellulaire, en plus des défenses basales). Dans un certain nombre d'interactions, les bactéries phytopathogènes disposent d'effecteurs Hrp leur permettant de contourner ces défenses pour réussir l'infection. L'un des premiers rôles des effecteurs Hrp injectés dans la cellule hôte est de supprimer les défenses activées suite à la détection du pathogène. Cette détection est en général liée à la présence de motifs conservés à la surface des pathogènes, les PAMPs (**P**athogen-**A**ssociated **M**olecular **P**atterns), qui sont reconnus par les cellules hôtes via des récepteurs type RLK (**R**eceptor-**l**ike **k**inase) ou type NBS-LRR (Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich Repeat). Mais certains effecteurs Hrp peuvent également interférer avec les réponses résultant d'une interaction R-Avr (protéine de résistance R et l'effecteur Avr). C'est par exemple le cas d'interaction AvrPtoB qui est capable d'inhiber les réponses découlant de la reconnaissance de l'effecteur AvrPto par la protéine de résistance Pto dans le cadre de l'interaction incompatible de *Pseudomonas syringae* avec le plant de tabac (Cheng *et al.*, 2011).

Des effecteurs de T3SS possédant une activité protéolytique. Les protéases à cystéine et métalloprotéases ont été identifiées chez les pathogènes des animaux et des plantes et les bactéries symbiotiques de plantes. Par exemple, la protéine AvrPrt2 de *P. syringae* est une peptidase à cystéine qui dégrade la protéine RIN4 de plante qui joue un rôle important dans la défense immunitaire (Afzal *et al.*, 2011). Une autre protéase AvrPphB réalise un clivage d'une kinase de type récepteur PBS1 et inhibe ainsi la réponse hypersensible HR (Shao *et al.*, 2002).

IV.4. Le signal de sécrétion de T3SS.

Les acides aminés 7 à 15 des protéines YopE, YopH, YopN et YopQ chez *Yersinia* sont suffisants pour assurer la sécrétion d'une protéine rapporteur par le T3SS dans les conditions de basse concentration en calcium (Sorg *et al.*, 2005 ; Blaylock *et al.*, 2008). Par contre, l'injection de ces protéines dans la cellule hôte nécessite la présence d'un fragment supplémentaire de la protéine portant les résidus de 70 à 100 (Cheng *et al.*, 2001).

Les dix-sept premiers acides aminés de l'effecteur YopH forment une hélice- α amphipathique, tandis que les quinze premiers résidus de YopE ont une tendance de former un feuillet- β

amphipathique (Evdokimov *et al.*, 2001). Il a été donc suggéré que ce caractère amphipathique joue un rôle dans la reconnaissance.

Cependant, d'autres études ont proposées que le signal de sécrétion peut être représenté par la structure secondaire de l'ARNm plutôt que la séquence d'acides aminés (Anderson *et al.*, 1997).

En conclusion, deux hypothèses sur la nature du signal de sécrétion sont probables : 1) le signal de sécrétion est représenté par une séquence N-terminale ou 2) une partie 5' de l'ARNm de substrats peut assurer le rôle de ce signal.

IV.5. Le modèle de reconnaissance de substrats par le T3SS.

Dans certains cas, la présence d'une séquence signal N-terminale est suffisante pour assurer la sécrétion de protéines rapporteurs par le T3SS (Crawford *et al.*, 2002). Par contre, dans la majorité de cas, l'efficacité de translocation est plus élevée lorsque le domaine de liaison au chaperon est aussi présent et la translocation s'effectue en présence du chaperon associé (Crawford *et al.*, 2002 ; Charpentier *et al.*, 2004 ; Mills *et al.*, 2008).

Les données collectées chez les différents T3SS ont confirmé que les chaperons jouent un rôle important dans la sécrétion des effecteurs. De plus, les interactions de chaperons avec trois composants de T3SS ont été mises en évidence. Notamment, ils interagissent avec l'ATPase (YscN) (Sorg *et al.*, 2006), la protéine YscQ qui forme un anneau à la base du corps du T3SS dans le cytoplasme et la protéine membranaire YscV. Les interactions entre chaperon FlgN et la protéine FlhA (un homologue de YscV) ont été détectées dans le système d'assemblage du flagelle (Akeda & Galan, 2005).

L'ensemble de ces données a permis de proposer un modèle de la reconnaissance et de la sécrétion de substrats de T3SS dans l'ordre hiérarchique (Thomas *et al.*, 2012) (Figure 24). Le chaperon de classe I peut interagir avec plusieurs effecteurs, qui sont produits à des moments différents et ont une affinité variable vis-à-vis du chaperon. Le chaperon interagit d'abord avec l'effecteur ayant l'affinité la plus forte. Ce complexe va être reconnu par l'ATPase YscN et le complexe tripartite va être pris en charge par la machinerie du T3SS. Le chaperon dimérique est aussi capable d'interagir avec deux autres composants du T3SS, YscV et YscQ. L'hydrolyse de l'ATP par YscN favorise la dissociation du complexe chaperon-effecteur et permet à l'effecteur d'entrer dans le corps basal du T3SS. Le chaperon ainsi libéré peut potentiellement d'interagir

avec un autre effecteur dans le cytoplasme. Il est aussi possible que l'effecteur soit pris en charge par le T3SS indépendamment du chaperon grâce à une interaction de sa séquence N-terminale avec les composants du système (Botteaux *et al.*, 2009).

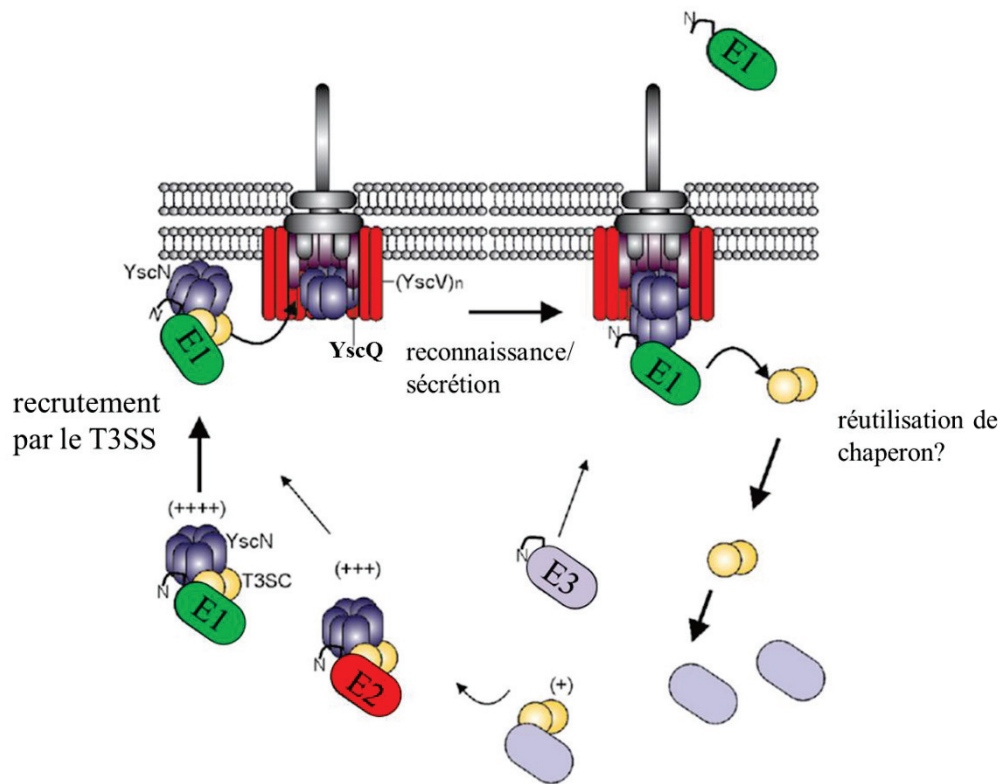


Figure 24. Modèle de reconnaissance du complexe chaperon-effacteur par le T3SS.

Les effecteurs sont représentés en couleur verte, rouge et violet avec les noms E1, E2 et E3, ce qui représente l'ordre de leur sécrétion par le T3SS. Le nombre de (+) est lié à la possibilité d'être pris en charge par le T3SS. Le chaperon est représenté sous la forme de deux cercles jaunes. L'ATPase YscN est représentée sous la forme d'un hexamère dans le cytoplasme et d'une dodécamère quand elle est associée à la membrane. La protéine YscQ (en gris) forme un anneau à la base de la machinerie de T3SS qui est situé proche d'un oligomère de YscV (en rouge). La lettre N attachée à l'effecteur représente la séquence N-terminale (Thomas *et al.*, 2012).

V. Le système de sécrétion de type IV (T4SS).

V.1. Introduction.

Les systèmes de sécrétion type IV (Type IV secretion system, T4SS) sont responsables du transport de protéines et d'ADN à l'intérieur du cytoplasme de cellules cible d'eucaryotes ou des bactéries. Les T4SSs sont largement répandus chez les bactéries à Gram négatif, mais également présents chez les bactéries à Gram positif. Ce système a énormément évolué au niveau de l'architecture de la machinerie, des types de substrats sécrétés et du mécanisme impliqué dans le contact avec la cellule cible (Alvarez-Martinez & Christie, 2009).

En effet, le nom T4SS réunit trois sous-familles des systèmes de sécrétion (Guglielmini *et al.*, 2013). La première sous-famille contient les systèmes de conjugaison, elle est la plus large et la plus répandue (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). Le système de conjugaison est utilisé pour transporter l'ADN simple brin et une ou plusieurs protéines à travers de l'enveloppe d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse. Les systèmes de conjugaison ont été décrits chez les bactéries à Gram négatif, à Gram positif et chez certaines archées (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). Souvent, les gènes codant ces systèmes ont portés par les plasmides, par exemple, les plasmides de conjugaison F, R388, pKM101, RP4 chez *E. coli* ou le système de transfert de l'ADN-T chez *A. tumefaciens*.

La deuxième sous-famille de T4SSs est responsable de la sécrétion de protéines effecteurs. Ce type de T4SS délivre les effecteurs directement dans le cytosol de cellules eucaryotes pour favoriser la colonisation par les bactéries et leur survie dans les cellules et les tissus d'hôte. Ce type de système est utilisé par plusieurs bactéries pathogènes : *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Coxinella burnetti*, *Bartonella* spp., *Brucella* spp. et *Rickettsia* spp. (Terradot *et al.*, 2011).

La troisième sous-famille réunit les systèmes d'import/export des substrats du/vers le milieu extracellulaire (Zechner *et al.*, 2012). Plusieurs souches de *Neisseria gonorrhoeae* possèdent une région d'ADN d'environ 57 kb qui code un T4SS (Ramsey *et al.*, 2011). Cette sous-famille inclut aussi le système Ptl de *B. pertussis* qui transporte la toxine pertussique PT composé de plusieurs sous-unités à travers la membrane externe (Locht *et al.*, 2011) et le système ComB de *H. pylori* qui fonctionne comme système de compétence pour importer de l'ADN exogène (Stingl *et al.*, 2010).

Le séquençage intensif de génomes bactériens au cours de ces dernières années a mis en évidence la présence des gènes de T4SS chez plusieurs espèces bactériennes, ce qui a permis de proposer un modèle du T4SS dit « minimal ». Ce modèle ne contient que les parties les plus essentielles retrouvées récemment chez les espèces du genre *Streptococcus* (Zhang *et al.*, 2012). Il a été démontré que ce type de T4SS « minimal » est largement répandu chez les bactéries à Gram positif et il est également présent chez les bactéries à Gram négatif.

V.2. Les composants essentiels de T4SS chez les bactéries à Gram négatif.

Le T4SS le mieux étudié est celui d'*A. tumefaciens*. Il est composé de 11 composants VirBs et VirD4 qui sur la base de leurs fonctions et localisation peuvent être regroupés en 4 parties : les ATPases, la translocase, le complexe de base et le pilus/adhésine (Figure 25). Des composants

accessoires, appelés T4CPs (type-IV coupling proteins, protéines associées au T4SS) assurent des rôles supplémentaires dans la sécrétion par le T4SS.

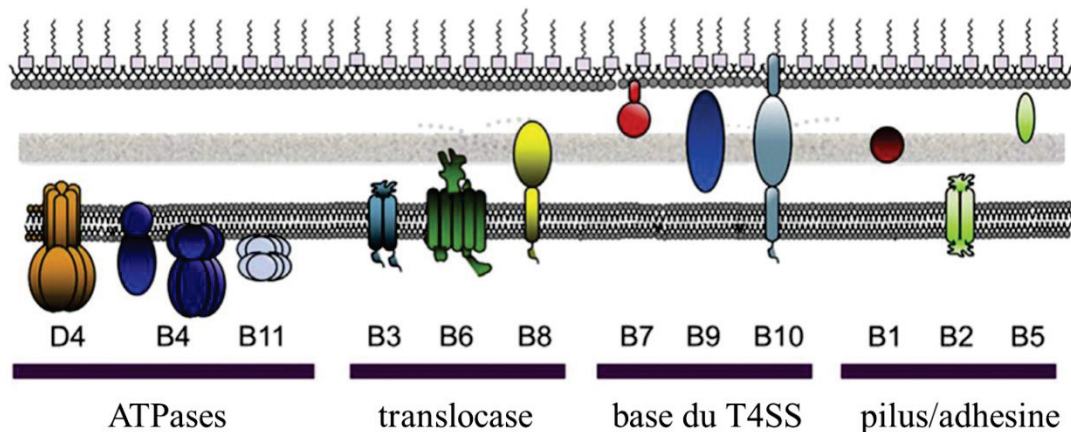


Figure 25. Organisation du T4SS chez *A. tumefaciens*.

Les trois ATPases sont localisées dans ou associées avec la membrane interne. La protéine VirB7 est une lipoprotéine, la protéine VirB10 connecte deux membranes (Bhatti *et al.*, 2013).

V.2.1. Les ATPases.

Les trois ATPases, VirD4, VirB4 et VirB11 sont localisées dans le cytoplasme ou parfois sont associées ou insérées dans la membrane interne formant ainsi le réseau énergétique du T4SS (Atmakuri *et al.*, 2003) (Figure 25). L'ATPase VirD4 est impliquée dans le recrutement des substrats. Cette protéine possède un domaine transmembranaire N-terminal et un grand domaine cytoplasmique (Rego *et al.*, 2010). VirD4 est proche de la protéine TrwB codée par le plasmide de conjugaison R388. Il a été démontré que le domaine transmembranaire de TrwB joue un rôle dans la stabilité, la reconnaissance de substrat et l'oligomérisation (Hormaeche *et al.*, 2006). La protéine TrwB purifiée possède une activité ATPasique qui est stimulée en présence d'ADN. TrwB est également capable de former des oligomères. Ces activités de TrwB sont renforcées par la présence de lipides (Tato *et al.*, 2005) (Figure 26 A).

La protéine VirB11 est une ATPase de la famille AAA qui contient également l'ATPase GspE du T2SS et l'ATPase du système de pili de type IV (T4P) et les ATPases du T3SS et T6SS (Savvides *et al.*, 2012). Les ATPases de type VirB11 sont normalement associées aux systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram négatif et elles ne sont pas présentes chez les bactéries à Gram positif (Alvarez-Martinez & Christie *et al.*, 2009). Cette ATPase est aussi absente de certains T4SSs chez les bactéries à Gram négatif. L'ATPase VirB11 est active sous la forme d'un hexamère. La structure de cette ATPase est composée d'un domaine N-terminal (NTD) et un domaine C-terminal (CTD) (Savvides *et al.*, 2003). Le site de liaison du nucléotide est situé à l'interface entre ces deux domaines.

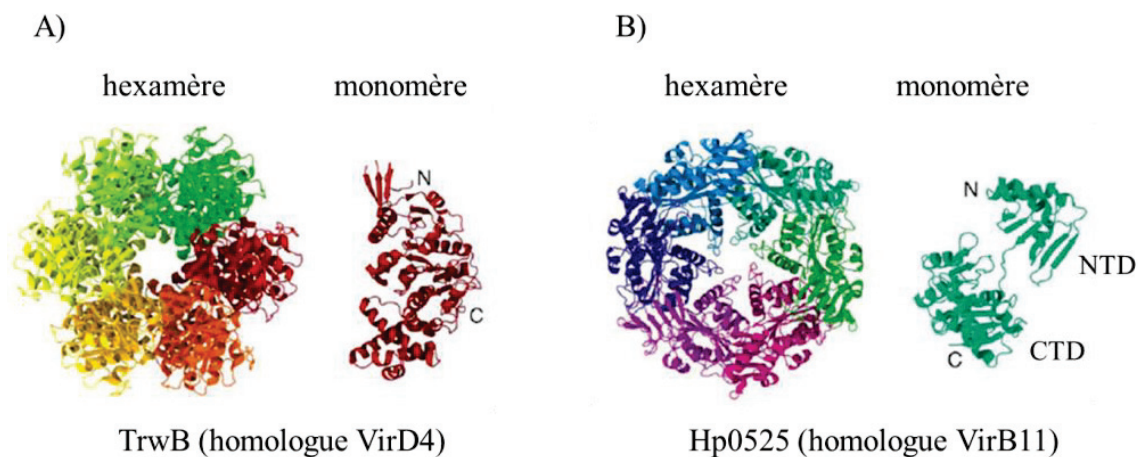


Figure 26. Structure cristalline d'ATPases de T4SS.

A) Structure de TrwB d'*E. coli*, un homologue de VirD4 (Gomis-Ruth *et al.*, 2001). B) Structure de Hp0525 de *H. pylori*, un homologue de VirB11 (Savvides *et al.*, 2003). Les structures sont présentées sous les deux formes : hexamérique et monomérique. NTD – domaine N-terminal, CTD - domaine C-terminal.

La troisième ATPase du T4SS, VirB4, est un composant indispensable de tous les T4SSs (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). Les sous-unités de ce composant sont proches de protéines T4CPs, leur domaine C-terminal et de liaison au nucléotide (NBD) sont aussi proches de ceux des protéines T4CPs. Cependant, aucune évidence directe n'a été fournie quant à l'état fonctionnel de cette ATPase, monomérique ou oligomérique. Certaines protéines homologues ont été purifiées sous la forme d'un monomère, par exemple, la protéine VirB4 de *L. pneumophila* et de *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* (Durand *et al.*, 2011 ; Wallden *et al.*, 2012) ou sous la forme d'un dimère, dans les cas de la protéine TraB codée par le plasmide pKM101 et la protéine PrgJ codée par pCF10 (Chen *et al.*, 2008 ; Durand *et al.*, 2010).

V.2.2. Le complexe de base de T4SS.

La structure du complexe de base du système codé par le plasmide pKM101 a été résolue par microscopie électronique (Waksman & Fronzes, 2010). Cette structure a démontré que les composants VirB7, VirB9 et VirB10 sont étroitement associés et forment une structure insérée dans les deux membranes : interne et externe. Ce complexe de base a une forme cylindrique un le diamètre externe de 185 Å et une hauteur de 185 Å comprenant deux parties : la partie extérieure ou partie O (outer) et la partie intérieure ou partie I (inner). Sur la structure ces deux parties sont connectées par des zones denses (Fronzes *et al.*, 2009) (Figure 27).

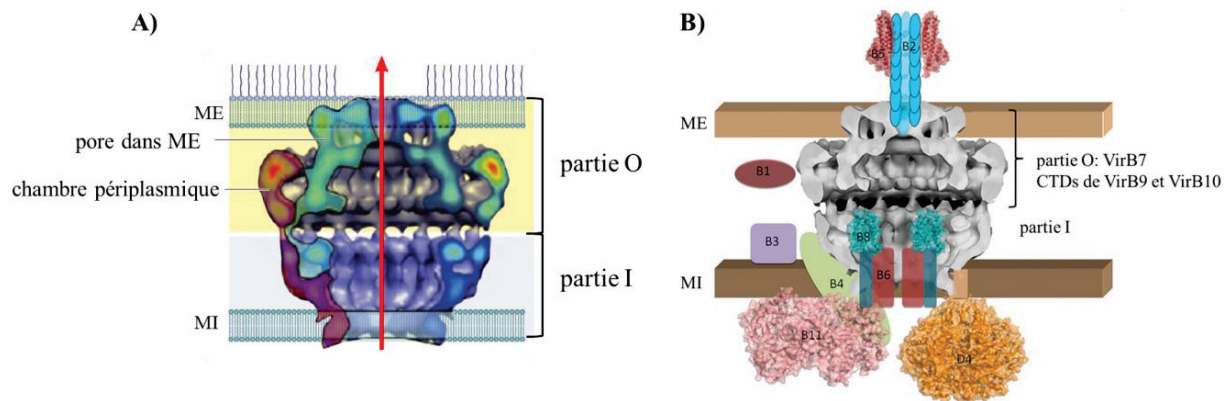


Figure 27. Structure et localisation du complexe de base de T4SS.

A) Structure du complexe de base composé de protéines TraN/VirB7, TraO/VirB9, et TraF/ VirB10 (Fronzes *et al.*, 2009). Le pore dans la membrane externe est formé par les protéines TraN/VirB7, TraO/VirB9, la partie périplasmique est formée par la protéine TraF/VirB10. Le passage des substrats est indiqué avec une flèche rouge. B) Positionnement du complexe de base avec les autres composants de T4SS.

La structure cristalline de la partie du T4SS située dans la membrane externe a été déterminée (Chandran *et al.*, 2004). Elle est composée d'un anneau hydrophobe constitué de protéines VirB10 qui forme un pore dans la membrane externe. La microscopie électronique et la cristallographie aux rayons X ont fourni des informations différentes sur la taille de ce pore. Il a été observé que cette partie du complexe interagit aussi avec les protéines B2 qui jouent un rôle dans la régulation du transport à travers la membrane externe.

V.2.3. Les composants de T4SS situés dans la membrane interne : VirB3, VirB6, VirB8.

Ces composants ont été découverts comme des sous-unités du T4SS qui sont connectées aux ATPases du système (Figure 25 ; Figure 27 B). VirB3 est une petite protéine hydrophobe qui a été souvent co-fractionnée avec l'ATPase VirB4 (Alvarez-Martinez & Christie *et al.*, 2009). La protéine VirB6 a évolué dans deux directions. La première classe contient VirB6 d'*A. tumefaciens*, une protéine d'environ 300 résidus qui possède 5 ou plus domaines transmembranaires et un grand domaine périplasmique central (Alvarez-Martinez & Christie *et al.*, 2009). La deuxième classe réunit les protéines VirB6s plus larges, composées de 500 résidus ou plus et possédant un domaine N-terminal polytopique et un grand domaine C-terminal hydrophile (Alvarez-Martinez & Christie *et al.*, 2009). Par exemple, la protéine TraG codée par le plasmide F d'*E. coli* et SXT ICE de *Vibrio cholerae* appartiennent à cette classe (Marrero & Waldor, 2007).

VirB8 est une protéine polytopique avec un court domaine cytoplasmique à l'extrémité N-terminale, un domaine périplasmique et un grand domaine C-terminal (Baron, 2006). Les

structures des domaines périplasmiques de VirB8 de *Brucella suis* et d'*A. tumefaciens* et de la sous-unité TcpC codée par le système de conjugaison de *Clostridium perfringens* ont été déterminés (Porter *et al.*, 2006). Les sous-unités de VirB8 sont organisées en dimères ou trimères dans les structures cristallines et les analyses par mutagenèse ont démontré que cet état multimérique a une signification physiologique. De plus, des expériences de pontage ont démontré que l'ADN-T contacte cette protéine, suggérant que la protéine VirB8 fait la partie du canal de translocation (Cascales and Christie, 2004). Plusieurs mutations dans la protéine VirB6 affectent l'interaction entre VirB8 et l'ADN-T (Jakubowski *et al.*, 2003).

La protéine VirB8 interagit avec plusieurs autres protéines VirB et assume un rôle d'initiation essentiel à l'assemblage et la stabilisation de la machinerie. Un des modèles actuels suggère que les protéines VirB4, VirB11, VirD4 et VirB10 forme un grand complexe (Figure 27B). Par contre, ces propositions restent à confirmer.

V.2.4. Le pilus.

Les sous-unités de protéines VirB2 et VirB5 forment un pilus exposé dans le milieu extracellulaire. Le pilus du T4SS peut servir comme conducteur de substrats ou pour l'adhésion (Waksman & Fronzes, 2010). Chez *A. tumefaciens*, la majeure partie du pilus est composée des sous-unités de la protéine VirB2, tandis que la protéine VirB5 est assez minoritaire. La structure d'un homologue de VirB5, la protéine TraC a été résolue (Yeo *et al.*, 2003). Cette protéine est composée d'un paquet de trois hélices et d'une petite partie globulaire. Il a été démontré que cette protéine est localisée en haut du pilus-T (Aly & Baron, 2003) et joue un rôle dans l'adhésion et la reconnaissance de l'hôte (Yeo *et al.*, 2003).

Il a été suggéré que deux complexes différents peuvent être formés par le même T4SS pour assurer un de deux processus possibles, la sécrétion et la formation d'un pilus. Ainsi, après la formation du complexe de base, il existe probablement une bifurcation dans l'assemblage qui assure la formation d'un des deux complexes : un complexe pour la sécrétion et un autre pour la formation de pilus (Rego *et al.*, 2010). De plus, certaines mutations dans les protéines VirB séparent ces deux fonctions du T4SS (Sagulenko *et al.*, 2001 ; Zhao *et al.*, 2001 ; Jakubowski *et al.*, 2009).

V.3. La comparaison entre T4SS chez les bactéries à Gram négatif et Gram positif.

Les études du T4SS chez les bactéries à Gram positif sont importantes car ce système de sécrétion est responsable de la dissémination de gènes de résistance aux drogues et de la virulence chez de nombreuses espèces pathogènes (Grohmann *et al.*, 2003). Ces études ont

permis de mettre en évidence que le mécanisme de recrutement du substrat par T4CP est similaire à celui du T4SS chez les bactéries à Gram négatif (Alvarez-Martinez & Christie *et al.*, 2009 ; Grohmann *et al.*, 2003). Les relaxases, impliquées dans T4CP agissent sur le transfert d'ADN par le mécanisme qui met en jeu quelques résidus tyrosine formant un lien avec l'ADN transféré. Dans ce cadre, rien n'est connu sur les signaux de sécrétion. Il est possible que la relaxase porte un motif qui peut servir de signal de reconnaissance. Les interactions entre la relaxase et les facteurs associés ont été mis en évidence grâce à la technique de double-hybride et co-purification (pull-down). Dans le cas du système de transfert pCF10 deux protéines, la relaxase PcfG et le facteur accessoire PcfF, interagissent avec le composant T4CP, la protéine PcfC. Il a été démontré que PcfC peut fixer l'ADN *in vitro* (Chen *et al.*, 2008).

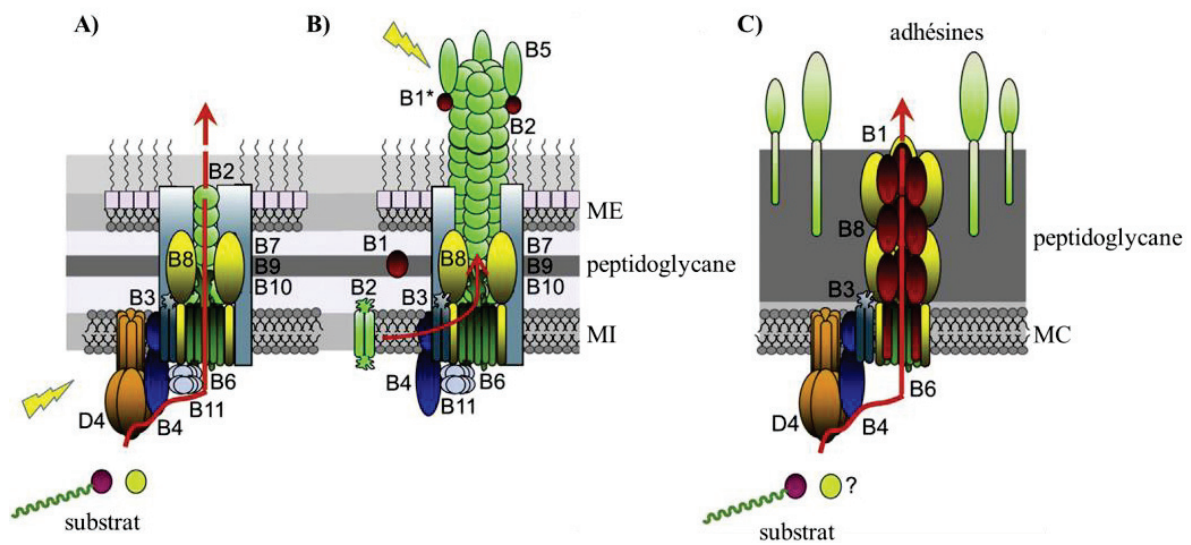


Figure 28. Modèles de T4SSs.

A) Architecture du canal de translocation formé par les protéines VirB/VirD4 chez les bactéries à Gram négatif. Les protéines VirB4 et VirD4 sont présentées par les mêmes couleurs qu'à la Figure 25. Le substrat est présenté par ADN-T (ziguezag en vert) avec la relaxase (en rouge foncé) et la protéine-effecteur (en vert clair). B) Modèle de pilus de conjugaison de VirB/VirD4. La formation du pilus nécessite des changements conformationnels dans la structure du complexe de base. Les protéines VirB1/VirB8 mais pas VirD4 sont nécessaires à l'assemblage du pilus. C) Modèle du canal de translocation de T4SS chez les bactéries à Gram positif. Les adhésines sur la surface de la paroi cellulaire assurent la même fonction que les pili chez les bactéries à Gram négatif. Le passage du substrat est indiqué avec une flèche rouge (Bhatty *et al.*, 2004).

L'accumulation de données expérimentales a permis de conclure que le transport des substrats à travers la membrane cytoplasmique est bien conservé aux niveaux mécanistique et structural chez les bactéries à Gram positif et négatif (Bhatty *et al.*, 2013). Ainsi, les systèmes de transfert pCF10 d'*Enterococcus faecalis*, pCW3 de *Clostridium perfringens*, pIP501 de *Streptococcus agalactiae*, Tn916 et ICEBs1 de *Bacillus subtilis* possèdent six sous-unités conservées similaires

à celles d'*A. tumefaciens* : VirD4, VirB1, VirB3, VirB4, VirB6 et VirB8 (Figure 28). De plus, les six sous-unités équivalentes sont présentes dans la majorité des T4SS chez les bactéries à Gram positif. Toutes les sous-unités VirBs/VirD4, à l'exception de la protéine VirB1, sont nécessaires au transfert des substrats à travers la membrane cytoplasmique chez les bactéries à Gram négatif. Les protéines homologues de ces composants du T4SS assurent les mêmes fonctions chez les bactéries à Gram positif (Porter *et al.*, 2012 ; Steen *et al.*, 2009).

V.4. Le mécanisme de reconnaissance de substrat par le T4SS.

Une information importante sur le mécanisme de reconnaissance de substrat a été obtenue dans les expériences de TrIP (transfer DNA immunoprécipitation) réalisées chez *A. tumefaciens* (Cascales *et al.*, 2004). Il a été démontré que l'ADN-T a des contacts avec les composants VirD4, VirB11, VirB6, VirB8, VirB2 et VirB9 pendant le transfert. Les autres protéines, VirB3, VirB4, VirB7 et VirB10 participent directement au transfert de substrat. Par ailleurs, l'ATPase VirD4 semble être le premier composant du T4SS qui interagit avec le substrat de manière indépendante de l'hydrolyse d'ATP (Atmakuri *et al.*, 2004).

Les études réalisées sur le T4SS d'*A. tumefaciens* et de *L. pneumophila* ont mis en évidence un simple motif, composé de résidus hydrophobes ou chargés positivement, situé à l'extrémité C-terminale de protéines-effecteurs et nécessaire à leur sécrétion. De plus, ce motif porte des résidus hydrophobes ou proline dans les positions -3 et -4 (Nagai *et al.*, 2005). Par contre, il est bien possible que ce simple mécanisme de reconnaissance de substrats chez *A. tumefaciens* et *L. pneumophila* ne soit pas universel.

Les autres exemples de signaux de sécrétion plus complexes ont été trouvés chez *Bartonella*. Ils sont composés de deux parties : un motif chargé mais pas conservé qui est combiné avec un autre motif représenté par un domaine conservé appelé BID (**B**ep **i**ntracellular **d**elivery) (Schulein *et al.*, 2005). L'architecture de ces motifs est commune avec celle de substrats de Cag de *H. pylori*. L'effecteur CagA possède un motif C-terminal, appelé TS, composé d'une vingtaine de résidus, qui est adjacent à la région d'interaction avec le chaperon CagF (Hohlfeld *et al.*, 2006). Ensemble, ces deux régions suffisent au recrutement de CagA par l'appareil de sécrétion. Des relaxases, quant à elles, possèdent les signaux plus larges et plus complexes. La construction de protéines chimériques entre des relaxases de type F et la protéine MobA du plasmide R1162 a permis de démontrer que chacun des deux TSs isolés dans des positions intérieures de la protéine est capable de moduler la sécrétion de manière indépendante par les T4CPs de conjugaison (Parker & Meyer, 2007 ; Lang *et al.*, 2010). Le motif TS de type F est conservé dans deux types de relaxases. Les composants du T4SS peuvent reconnaître et

transférer des protéines d'un système assez proche. Ce principe a été utilisé pour identifier les effecteurs du T4SS de *Coxiella burnetii* en se servant du système Dot/Icm de *L. pneumonia* (Williams & Schildbach, 2006). Les relaxases constituent un exemple de variabilité parmi des substrats du T4SS. Par ailleurs, la quantité potentielle des différents systèmes de type T4SS présents dans une seule bactérie est aussi assez variable. Au contraire, les effecteurs codés par les plasmides R1162 et RSF1010 sont ubiquitaires et peuvent être transportés par plusieurs T4SS de conjugaison ou les T4SS sécrétant des effecteurs. La protéine MobA d'*A. tumefaciens* et les autres relaxosomes sont aussi labiles et peuvent être sécrétés par des systèmes éloignés. Comme pour les autres substrats, la sécrétion de MobA par le T4SS d'*A. tumefaciens* est dépendante d'un motif chargé positivement située à l'extrémité C-terminale.

V.2.7. Le rôle des chaperons dans le T4SS.

L'importance des chaperons dans le processus de sécrétion a été premièrement décrite pour le T3SS, où ils maintiennent les substrats du système dans un état compatible avec la sécrétion et participent également à la protection des cellules bactériennes de la toxicité des substrats transportés par ce système. Le rôle de chaperons a été aussi démontré dans le cas des T4SS (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). Par exemple, la protéine VirE1 de *A. tumefaciens* est nécessaire à la translocation de l'effecteur VirE2 dans les cellules des plantes (Zhao *et al.*, 2001).

La majorité de chaperons des T4SS sont des protéines d'une petite taille d'environ 15 kDa avec pI acide, et qui contiennent des hélices amphipathiques. La structure du complexe du chaperon VirE1 avec son substrat VirE2 a mis en évidence un arrangement inhabituel de deux domaines de la protéine VirE2 autour du chaperon VirE1 (Figure 29A, 29C).

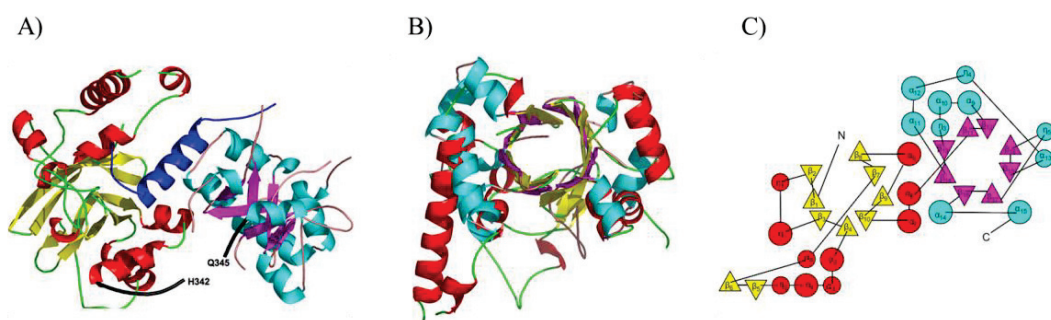


Figure 29. Structure du complexe VirE1/VirE2.

A) Le complexe VirE1/VirE2. L'hélice de VirE1 est représentée en bleu. Les hélices- α du domaine N-terminal de VirE2 sont représentées en rouge et les brins- β en jaune. Les hélices- α du domaine C-terminal sont représentées en bleu clair et les brins- β en magenta. B) Superposition de deux domaines N-terminal et C-terminal de VirE2. C) Topologie de la protéine VirE2.

Deux domaines de VirE2 possèdent une faible homologie de séquence, mais adoptent un repliement similaire (Figure 29 B). Le chaperon VirE1 ne participerait pas directement dans l'adressage du substrat VirE2 vers la machinerie de T4SS, mais plutôt protège VirE2 d'une polymérisation prématurée (Zhao *et al.*, 2001).

Il a été démontré que le transport de substrats par le système Dot/Icm (T4SS de *L. pneumophila*) est dépendant de la présence de protéines IcmS, IcmW et LvgA (Ninio *et al.*, 2005 ; Vincent & Vogel, 2006) qui peuvent jouer un rôle des chaperons.

Il a été démontré que la protéine IcmS est capable de former des hétérodimères avec les autres chaperons, IcmW ou LvgA. Ces hétérodimères peuvent contrôler le transport de plusieurs substrats du T4SS de *L. pneumophila*. Les fonctions des deux complexes IcmS/IcmW et IcmS/LvgA sont similaires à celles de VirE1. En effet, l'interaction avec le complexe IcmS/IcmW provoque des changements conformationnels de l'effecteur SidG qui sont nécessaires à la reconnaissance de son extrémité C-terminale (Cambronne & Roy, 2007). Un autre candidat au rôle de chaperon est la protéine CagF qui assume le transport du substrat CagA chez *Helicobacter pylori* (Pattis *et al.*, 2007).

La majorité des interactions spécifiques détectées entre les chaperons du T4SS et leurs partenaires jouent un rôle de protection des sous-unités contre une multimérisation prématurée.

En conclusion, la présence d'un simple motif de sécrétion, composé de résidus hydrophobes ou chargés positivement, situé à l'extrémité C-terminale, a été décrite pour les protéines-effecteurs d'*A. tumefaciens* et *L. pneumophila*. Des signaux de sécrétion plus complexes ont été caractérisés pour des relaxases et les protéines secrétées par *Bartonella*. L'importance de chaperons pour la sécrétion a été mise évidence chez *A. tumefaciens*, *L. pneumophila* et *Helicobacter pylori*.

VI. Le système de sécrétion de type V (T5SS).

VI.1. Introduction.

Le système de sécrétion de type V (T5SS) assure la sécrétion de protéines en deux étapes : premièrement les substrats traversent la membrane interne par le système d'exportation Sec ou Tat. Ensuite, la translocation à travers la membrane externe est assistée par le complexe Bam qui joue aussi un rôle majeur dans l'assemblage de protéines en tonneaux- β dans la membrane externe, ou le système Tam pour certains autotransporteurs (Selkrig *et al.*, 2012). Les facteurs de virulence sécrétés par le T5SS sont indispensables pour les pathogènes, les substrats sécrétés par T5SS chez les bactéries non pathogènes sont importants pour leur survie.

Les protéines sécrétées par le T5SS ont trois aspects communs : la présence d'une séquence signal reconnue par le système d'exportation, d'un domaine en tonneau β nécessaire à l'insertion dans la membrane externe et d'un domaine passager fonctionnel qui peut être exposé à la surface de la bactérie ou sécrété dans le milieu extracellulaire. Une classification du T5SS en cinq groupes a été récemment proposée (Leo *et al.*, 2012) (Figure 30) :

Le premier groupe, T5aSS, est constitué d'autotransporteurs classiques monomériques. Ces protéines sont composées d'un domaine N-terminal de 40 à 400 kDa (le domaine passager) et un domaine C-terminal conservé et organisé en brins β qui forment un tonneau β . Les autotransporteurs sont synthétisés avec une séquence signal Sec-dépendante à l'extrémité N-terminale ce que leur permet d'être exportés dans le périplasme. Le domaine en tonneau β est ensuite inséré dans la membrane externe et assure la sécrétion du domaine « passager ». Le domaine passager peut rester accroché ou être clivé et agir sous la forme d'une toxine soluble ou une enzyme (Henderson & Nataro, 2001) (Figure 30 A).

Le deuxième groupe, T5bSS est aussi appelé système de sécrétion à deux partenaires (TPS, two partner secretion) (Cotter *et al.*, 2005 ; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2013) (Figure 30 B). La principale caractéristique des systèmes TPS est que la sécrétion de la protéine effectrice à travers la membrane externe (TpsA) requiert une seconde protéine qui possède une structure en tonneau β (TpsB).

Le troisième groupe, T5cSS, est constitué des autotransporteurs trimériques composés de trois polypeptides qui forment ensemble une structure en tonneau β (Lyskowski *et al.*, 2011) (Figure 30 C).

Le quatrième groupe, T5dSS, est représenté par la protéine PlpD (patatin-like protein), retrouvée chez *P. aeruginosa* (Salacha *et al.*, 2010). Cette protéine a une organisation unique puisqu'elle semble correspondre à une fusion entre un autotransporteur monomérique et un système TPS.

Le cinquième groupe, T5eSS, réunit les protéines de la famille intimine-invasine qui ont une ressemblance aux autotransporteurs classiques mais possèdent un ordre inversé de leurs domaines (Oberhettinger *et al.*, 2012).

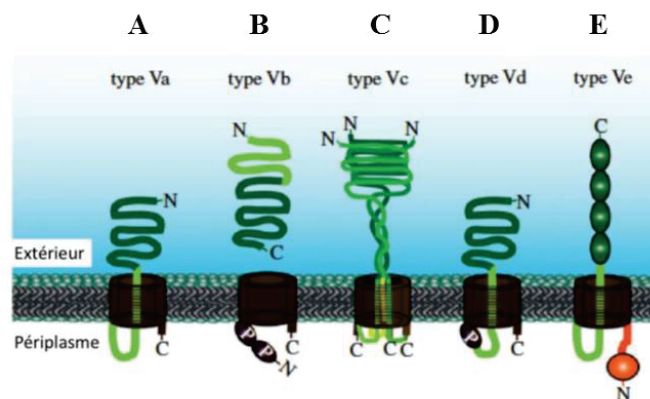


Figure 30. Représentation schématisque des différents groupes du T5SS.

Le domaine en tonneau β est représenté en brun, le domaine périplasmique en orange, le domaine de jonction ou domaine TPS en vert pâle, le domaine passager en vert foncé. Les domaines POTRA sont indiqués avec une lettre P (Leo *et al.*, 2012).

VI.2. T5aSS, les autotransporteurs monomériques.

Le nom d'autotransporteur provient du fait que toute l'information nécessaire à leur sécrétion est présente dans un seul polypeptide. En général, un autotransporteur monomérique est composé de quatre régions : une séquence signal N-terminale permettant la reconnaissance par le système Sec, un domaine passager fonctionnel, une région de jonction ou région auto-chaperon et un domaine C-terminal (domaine β) qui forme une structure en tonneau β dans la membrane externe (Henderson *et al.*, 2004). Le domaine passager des autotransporteurs monomériques sont variables en longueur et en séquence. Toutefois, avec la disponibilité de plusieurs structures d'autotransporteurs, il est maintenant apparent que, malgré la diversité de leur séquence primaire, les domaines passagers sont organisés de la même manière, en hélice β droite (Kajava & Steven, 2006). La première structure à avoir été publiée est celle de la pertactine, une adhésine de *Bordetella pertussis* (Emsley *et al.*, 1996). Le domaine passager de la pertactine est formé d'une hélice β de 16 tours, où chaque tour d'hélice est composé de 3 petits brins β connectés entre eux par des boucles de longueur variable. La résolution des structures d'autres autotransporteurs : Hbp et EspP d'*E. coli* (Otto *et al.*, 2005), IgAP et Hap de *Haemophilus influenzae* (Johnson *et al.*, 2009) a démontré la présence d'une hélice β centrale qui peut être complétée avec différents domaines globulaires. Par contre, il existe des exceptions : l'estérase EstA de *P. aeruginosa* a une structure globulaire composée d'hélices α et de boucles (van den Berg, 2010).

Le domaine β des autotransporteurs adopte une conformation en tonneau β typique des protéines de la membrane externe. Plus précisément, le domaine β forme un tonneau β comprenant 12 brins β reliés entre eux par des boucles de longueur variable (Figure 31A). Ce qui est intéressant, dans le cas des transporteurs trimériques de la famille T5cSS, est que cette structure est composée de trois peptides différents (Figure 31B). Une particularité commune à ce domaine β est la présence d'une hélice α au centre du tonneau. Cette hélice, présente chez tous les autotransporteurs monomériques est importante pour maintenir la forme du tonneau et probablement pour fermer le pore et maintenir l'intégrité membranaire.

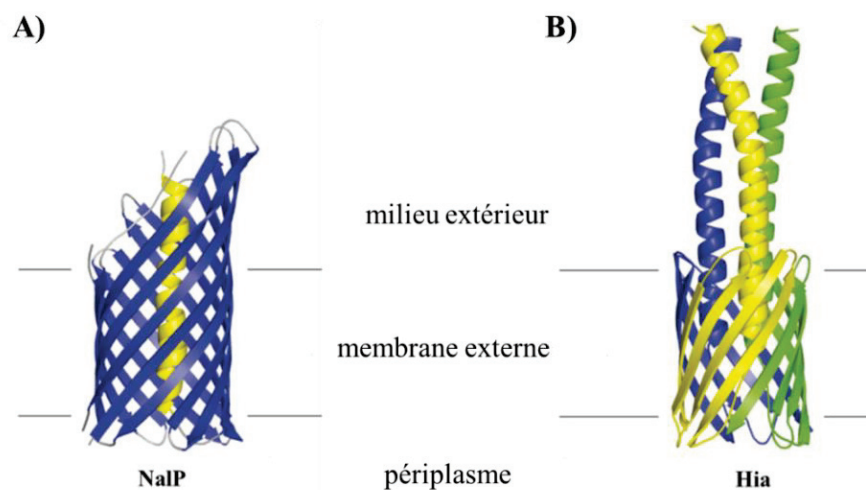


Figure 31. Structures du domaine β de T5aSS et T5cSS.

A) Structure de la protéine NalP de *N. meningitidis* (T5aSS) (1UYN, Oomen *et al.*, 2004). B) Structure de et l'autotransporteur trimérique Hia de *H. influenza* (T5cSS) (2GR7, Meng *et al.*, 2004).

La région des autotransporteurs monomériques localisée entre l'hélice α et le domaine passager est appelée domaine de jonction ou domaine auto-chaperon. Une structure unique du domaine de jonction est disponible pour l'autotransporteur IcsA de *S. flexneri* (Kuhnel & Diezmann, 2011). Il possède un repliement similaire au domaine passager et peut servir de base pour son repliement. C'est aussi la première région à être exposée lors du processus de translocation à travers la membrane externe (Dutta *et al.*, 2003 ; May & Morona, 2008).

VI.3. Biogenèse des autotransporteurs monomériques.

La sécrétion par le T5SS est dépendante de la présence de la protéine BamA (appelée aussi Omp85 ou YaeT). BamA forme un pore dans la membrane externe avec l'aide des certaines lipoprotéines, appelées BamBCDE, avec lesquelles BamA forme un hétéroooligomère. Ce

complexe est indispensable à l'assemblage et l'ancrage de protéines en tonneaux- β dans la membrane externe (Voulhoux *et al.*, 2003).

Une interaction directe entre BamA et le domaine β d'EspP a été mise en évidence (Ieva & Bernstein, 2009). De plus, tous les autotransporteurs étudiés à ce jour possèdent le motif de reconnaissance C-terminal requis pour l'interaction avec le complexe Bam. Il a été démontré que le domaine β d'EspP interagit avec les protéines SurA, BamA, BamB et BamD. Cependant, les protéines BamB, BamC et BamE ne sont pas essentielles pour une insertion optimale des autotransporteurs monomériques (Rossiter *et al.*, 2011).

Actuellement, il existe deux modèles de translocation du domaine passager à travers la membrane externe : le modèle BamA, et le modèle d'épingle à cheveux. Le modèle BamA suggère que le complexe Bam est essentiel pour l'insertion du tonneau β et pour la sécrétion du domaine passager (Figure 32). La formation d'une structure riche en brins- β de l'autotransporteur permet son adressage vers le complexe Bam (étape 1). Le domaine C-terminal, ou domaine de translocation, interagit avec les domaines POTRA (polypeptide translocation associated) de BamA, ce qui provoque son ouverture latérale (étape 2). Les autres protéines du complexe Bam peuvent fournir l'énergie à cette étape de l'ouverture du pore. Pendant la dernière étape, le domaine passager de l'autotransporteur passe à travers le pore formé par le complexe Bam (étape 3).

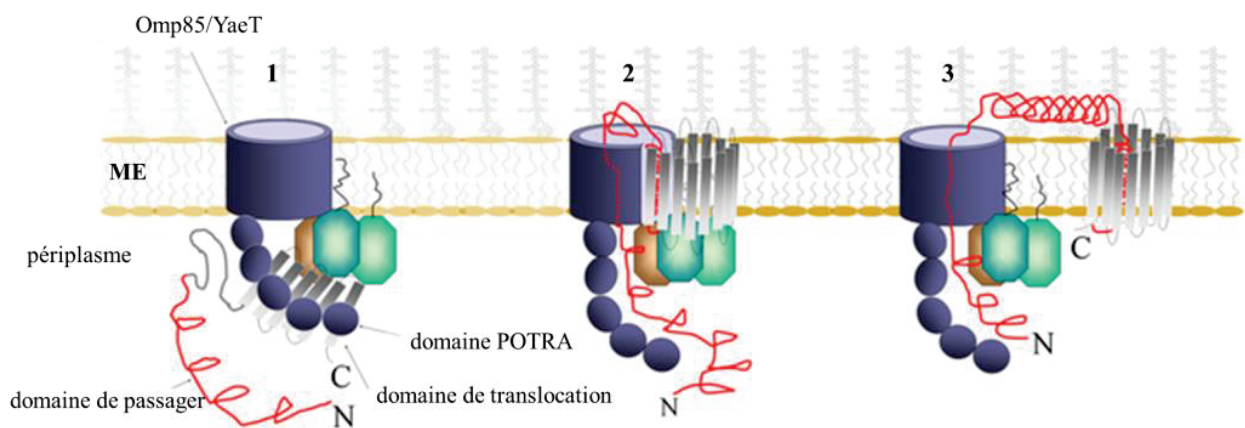


Figure 32. Modèle de sécrétion par le T5SS avec l'assistance du complexe Omp85.

La protéine Omp85(BamA) est représentée en bleu foncé, le domaine passager de l'autotransporteur est en rouge et le domaine de translocation est en gris.

Le modèle de biogenèse des autotransporteurs par le modèle de l'épingle à cheveux est présenté sur la Figure 33. Première étape est l'exportation par le système Sec. Dans le périplasme, les autotransporteurs vont interagir avec les chaperons périplasmiques DegP, SurA et Skp. La

séquence signal des autotransporteurs est souvent plus longue ce qui ralentit leur exportation par le système Sec et permet leur interaction avec le complexe Bam avant la coupure de la séquence signal. La séquence C-terminale de l'autotransporteur interagit avec les domaines POTRA de la protéine BamA. Le complexe Bam va assurer l'insertion du domaine β dans la membrane externe. Ensuite, la région de jonction va former une structure en épingle à cheveux à l'intérieur du pore du domaine β , ce qui initialise le transport du domaine passager à travers le pore formé dans la membrane externe. Deux chaînes polypeptidiques vont se trouver à l'intérieur du tonneau β simultanément, une chaîne va rester statique tandis que l'autre va se déplacer permettant le passage du domaine passager (Figure 33).

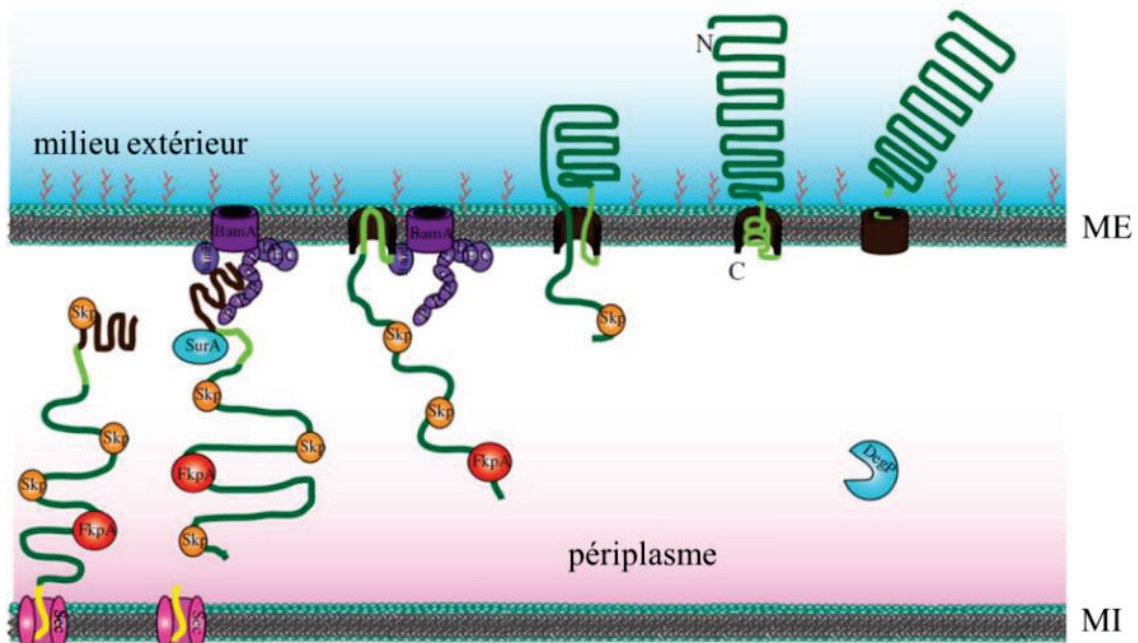


Figure 33. Biogenèse des autotransporteurs monomériques.

La séquence signal Sec est présentée en jaune. Les chaperons périplasmiques ont les couleurs suivantes : Skp en orange, FkpA en rouge, SurA et DegP en bleu. La séquence C-terminale de l'autotransporteur est indiquée en marron, les protéines du complexe Bam en violet. La région de jonction est présentée en vert clair et le domaine passager en vert foncé (Leo *et al.*, 2012).

VI.4. T5bSS, le système à deux partenaires.

Le T5bSS, appelé aussi le système à deux partenaires ou (TPS) est composé de deux protéines : le substrat TpsA et son transporteur TpsB. Chacune de ces deux protéines possède une séquence signal N-terminale leur permettant d'être exportée à travers la membrane interne. Le transporteur TpsB formera un pore dans la membrane externe nécessaire à la translocation du substrat TpsA.

En général, TpsA sont des protéines de grande taille (souvent plus de 3 000 acides aminés), leur séquence est formée de motifs répétés et elles adoptent préférentiellement une structure en forme d'une hélice β (Kajava & Steven, 2006). Les protéines TpsA possèdent une séquence signal permettant leur transport dans le périplasma via le système Sec. Le domaine TPS, ou domaine de sécrétion, est une région N-terminale d'environ 300 acides aminés qui est retrouvée chez toutes les protéines TpsA (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1996 ; Grass & Geme, 2000, Hodak *et al.*, 2006). Ce domaine TPS est nécessaire et suffisant pour l'interaction avec le TpsB et la sécrétion à travers la membrane externe. FHA, TpsA de *B. pertussis*, possède un domaine TPS à l'extrémité N-terminale et un pro-domaine, d'environ 1200 acides aminés localisé à l'extrémité C-terminale, qui est clivé lors du processus de sécrétion (Coutte *et al.*, 2001). Ce dernier domaine pourrait prévenir une dégradation prématurée de FHA mature dans le périplasma ou moduler la conformation finale de FHA (Mazar & Cotter, 2006).

Les protéines TpsB font partie de la superfamille TpsB/BamA des protéines de la membrane externe (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009). La structure de FhaC, le TpsB de *B. pertussis* permettant la sécrétion de FHA, a récemment été résolue (Clantin *et al.*, 2007). Cette protéine forme un tonneau β monomérique composé de 16 brins β antiparallèles et possède un module périplasmique essentiel à la sécrétion, contenant deux domaines POTRA. Une étude récente a démontré que le TpsB seul peut assurer la sécrétion de FHA *in vitro*, sans l'aide du complexe Bam (Fan *et al.*, 2012).

Le mécanisme du transport de protéines TpsA est similaire à celui des autotransporteurs. Le transport s'effectue en deux étapes avec une étape périplasmique. Le domaine TPS interagit avec les domaines POTRA de TpsB, ce qui initialise le passage de TpsA à travers le pore formé par TpsB. Il a été démontré que l'extrémité C-terminale de FHA est exposée à la surface de la bactérie, ce qui suggère que l'extrémité N-terminale de cette protéine reste accrochée à FhaC. La boucle extracellulaire de FhaC est nécessaire à la sécrétion et peut être impliquée dans la formation de l'épingle à cheveux.

En conclusion, la sécrétion par le T5SS s'effectue en deux étapes en utilisant le système d'exportation Sec, le complexe Bam pour l'insertion des domaines β dans la membrane externe et des chaperons périplasmiques. Les domaines passagers et TpsA adoptent préférentiellement une structure en forme d'une hélice β , composée de quelques tours, où chaque tour contient 3 brins β connectés entre eux par des boucles de longueur variable. Ce type de repliement est très similaire à celui des pectinases sécrétées par le système de type II de *D. dadantii* (Chapitre VIII.5). L'état exact de repliement de ce domaine dans le périplasma fait toujours

l'objet de controverse et il n'est pas exclu que le repliement pourrait fournir l'énergie au processus de sécrétion. Il est aussi bien possible que les substrats de T5SS et T2SS qui partagent un repliement similaire puissent aussi partager certaines similitudes lors de leur étape périplasmique.

VII. Le système de sécrétion de type VI (T6SS).

VII.1. Introduction.

Parmi les systèmes de sécrétion connus chez les bactéries à Gram négatif, le système de type VI (T6SS) a été découvert assez récemment. Au niveau évolutif et fonctionnel, ce système est proche de l'appareil d'injection de phage T4. Le système T6SS est utilisé pour transporter des protéines effecteurs à l'intérieur d'une autre cellule. Cette machinerie a été premièrement décrite chez les deux pathogènes humains, *P. aeruginosa* (Mougous *et al.*, 2006) et *Vibrio cholerae* (Pukatzki *et al.*, 2006). Chez les protéobactéries, les Actinobactéries et Planctomycètes, plus d'un quart des génomes séquencés à l'heure actuelle possèdent les gènes annotés comme ceux codant des composants de T6SS (Tseng *et al.*, 2009).

Le T6SS joue un rôle essentiel pour la virulence de pathogènes humains comme *V. cholerae*, *Edwardsiella tarda*, *P. aeruginosa*, *Francisella tularensis*, *Burkholderia mallei* et les pathogènes des plantes, *A. tumefaciens*, *Pectobacterium atrosepticum* et *Xanthomonas oryzae*. Il est aussi nécessaire à la colonisation efficace de racines par *Mezorhizobium loti* et *Rhizobium leguminosarum*. De plus, ce système est indispensable pour la formation des biofilms chez *Myxococcus xanthus*, *Dechloromonas aromatica* et *Rhodopirellula baltica* (Tseng *et al.*, 2009). Chez certaines bactéries, le T6SS accomplit un rôle clé dans le développement d'antagonisme contre les autres espèces bactériennes (Chou *et al.*, 2012). Par exemple, *P. aeruginosa* est capable de transporter les effecteurs chez *P. putida* et *V. cholerae* et les tuer (Basler *et al.*, 2013).

Le nombre exact de gènes des T6SS varie selon les espèces considérées, entre 15 et 20 (Bingle *et al.*, 2008). L'analyse bio-informatique a permis d'identifier 13 composants essentiels du système qui permettent assurer sa fonctionnalité (Boyer *et al.*, 2009). Les composants « core » de T6SS sont les suivants : i) les deux composants situés dans la membrane interne : IcmF (intracellular multiplication protein F) et DotU/IcmH (Zheng *et al.*, 2011) ; ii) la protéine ClpV de la famille d'ATPases AAA+ (ATPases associated with various cellular activites) (Pietrosiuk *et al.*, 2011) ; iii) la protéine Hcp (hemolysin co-regulated protein) et iiiv) la protéine VgrG (valine-glycine repet protein G) (Leiman *et al.*, 2009; Hachani *et al.*, 2011).

Il a été démontré que plusieurs protéines de T6SS possèdent une similarité avec les protéines du phage T4 (Pukatzki *et al.*, 2007; Leiman *et al.*, 2009; Bönemann *et al.*, 2010) (Figure 31). Il est possible que le mécanisme de la détection de la cellule hôte soit aussi proche de celui de bactériophage T4 (Kanamaru, 2009; Bönemann *et al.*, 2010).

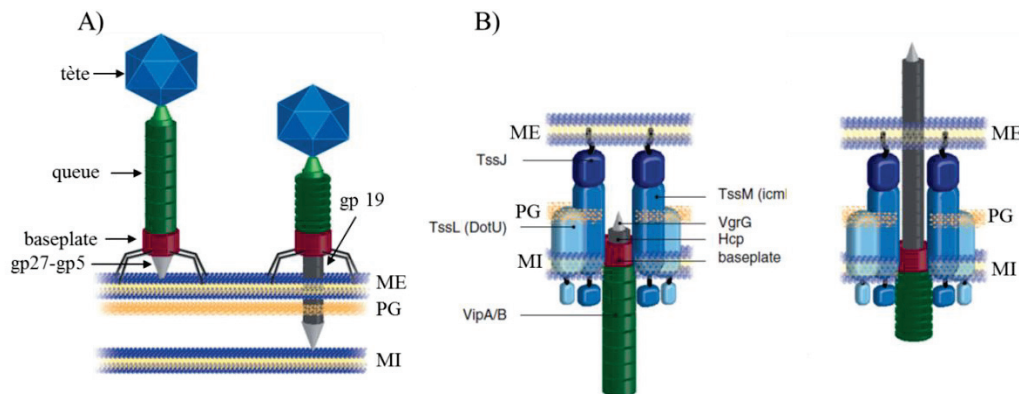


Figure 34. Comparaison de la structure et le mode d'action de bactériophage T4 et T6SS.

Les protéines homologues sont représentées avec les mêmes couleurs sur les structures de bactériophage T4 (A) et T6SS (B) : VgrG de T6SS et gp27/gp5 de phage ; Hcp et gp19 (Kapitein & Mogk, 2013).

La résolution de la structure des protéines Hcp et VgrG a permis de confirmer la parenté phylogénétique entre le T6SS et les machineries des bactériophages (Kanamaru, 2009 ; Bönemann *et al.*, 2010). La structure cristalline de Hcp est formé par les anneaux hexamériques (Mougous *et al.*, 2006). De plus, il a été démontré que cette protéine est capable de former des nanotubes d'un diamètre externe de 85 Å et interne de 40 Å et d'une longueur de 100 nm (Mougous *et al.*, 2006 ; Jobichen *et al.*, 2010). Cette structure est similaire de celle de tube de bactériophage formé par la protéine gp19 (Leiman *et al.*, 2009).

La protéine VgrG quant à elle, présente une similarité avec le complexe du « pic » de bactériophage formé par les protéines (gp27)₃-(gp5)₃. Ce complexe est utilisé par le phage pour percer une ouverture dans la paroi cellulaire de la bactérie, ce qui permet l'injection de l'ADN à l'intérieur du cytoplasme bactérien (Pukatzki *et al.*, 2007; Leiman *et al.*, 2009). La protéine VgrG forme une « aiguille » trimérique du côté terminal de la structure tubulaire. Cette « aiguille » peut se dissocier du tube Hcp, une fois que la paroi d'hôte a été percée (Bönemann *et al.*, 2010). De plus, certaines protéines VgrG ont des extrémités C-terminales plus longues ou possèdent sur leur extrémité C-terminale un domaine-effecteur. Ce type de VgrG a été appelé VgrG évoluées (Pukatzki *et al.*, 2009). Un autre composant du T6SS, la protéine HsiF, est similaire à la protéine de phage gp25 qui possède une activité de lysozyme. Cependant, aucune activité enzymatique n'a pu être détectée pour la protéine HsiF (Lossi *et al.*, 2011).

Les autres composants du T6SS ont été également caractérisés en détail. La protéine de la membrane interne IcmF interagit avec DotU/IcmH et avec la lipoprotéine SciN, elle-même ancrée dans la membrane externe et exposée dans le périplasme (Sexton *et al.*, 2004; Aschtgen *et al.*, 2008). Le complexe IcmF-DotU/IcmH-SciN représente le centre de la machinerie T6SS (Figure 34). Le domaine cytoplasmique de la protéine IcmF possède un motif Walker A impliqué dans la fixation de nucléotide et l'hydrolyse de l'ATP (Bönemann *et al.*, 2010). Il est probable que ce composant joue un rôle de fournisseur d'énergie pour le fonctionnement du T6SS (Ma *et al.*, 2009). Les tubes formés par les protéines VipA/VipB sont très dynamiques au niveau de la polymérisation, de la contraction et du désassemblage (Basler *et al.*, 2013). La machinerie de T6SS doit être ancrée dans la paroi bactérienne et correctement positionnée. Le complexe associé à la membrane interne a été identifié chez *E. coli* EAEC, il est composé des protéines suivantes : TssL (DotU), TssM (IcmF), TssJ (SciN) et TagL (SciZ) (Aschtgen *et al.*, 2010). La protéine TagL possède un domaine de fixation au peptidoglycane. Chez certaines bactéries, ce domaine est fusionné à la protéine TssL et permet un ancrage du T6SS dans la paroi cellulaire (Aschtgen *et al.*, 2010). Chez *E. coli* EAEC, la protéine TagL interagit avec la protéine de la membrane interne TssL qui elle-même forme un complexe avec la protéine TssM (Felisberto-Rodrigues *et al.*, 2011). Le domaine périplasmique de TssM interagit avec la lipoprotéine TssJ située dans la membrane externe (Aschtgen *et al.*, 2008). Par ailleurs, des interactions ont été mises en évidence entre VipA et Hcp et les domaines périplasmiques de TssM (IcmF) et TssL (Aschtgen *et al.*, 2008). Or, la protéine TssM (IcmF) est une ATPase essentielle du T6SS et l'hydrolyse de l'ATP est nécessaire au recrutement de Hcp et sa polymérisation (Ma *et al.*, 2012).

VII.2. Cycle de fonctionnement du T6SS.

Il a été proposé que les protéines VipA et VipB forment les tubes qui peuvent se contracter et fournir l'énergie pour l'injection des tubes Hcp avec la protéine VgrG. La protéine ClpV est probablement nécessaire à l'exportation des sous-unités de VipA et VipB dans le périplasme, qui est suivie d'une réorganisation de tubes formés par VipA/VipB et leur contraction (Figure 35).

La protéine ClpV appartient à la famille d'ATPases AAA+ qui contient notamment les ATPases impliquées dans le dépliement de substrat (Pietrosiuk *et al.*, 2011). L'ATPase ClpV est un composant essentiel au fonctionnement du T6SS. Deux étapes de l'assemblage du T6SS pourront nécessiter cette ATPase : i) la dépolymérisation de tubes composés de VipA/VipB dans le cytoplasme pour permettre ensuite leur transport dans le périplasme, où VipA et VipB vont se polymériser et former un « fourreau » et ii) la dépolymérisation de « fourreau » pour fournir

l'énergie nécessaire à sa contraction (Bonemann *et al*, 2010 ; Basler & Mekalanos, 2012). ClpV interagit spécifiquement avec le complexe VipA/VipB dans sa conformation contractée.

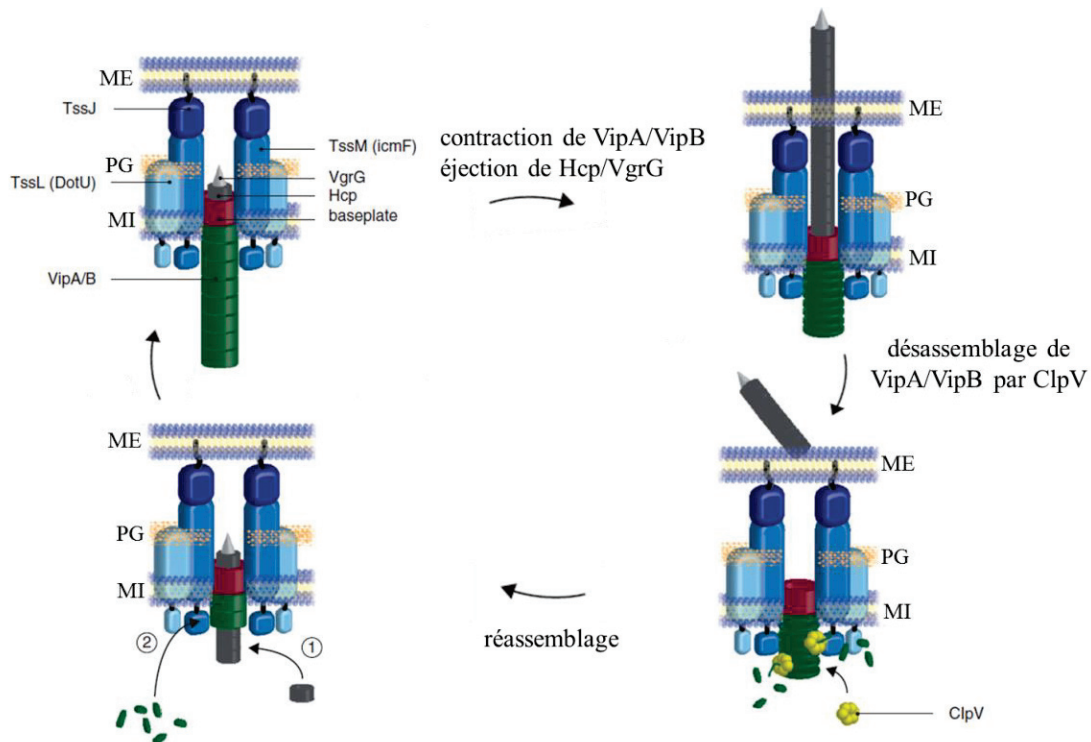


Figure 35. Cycle du fonctionnement de T6SS.

Le tube composé de monomères Hcp (en gris) est associé au sommet avec le trimère de VgrG. Les tubes Hcp sont couverts par les tubules composés de protéines VipA/VipB (en vert). Ces deux structures sont ancrées dans la membrane grâce au complexe TssJ, TssM(IcmF) et TssL (DotU) (en bleu). La contraction de tubules VipA/VipB provoque l'éjection du tube composé de Hcp et VgrG. Les tubules VipA/VipB contractés sont ensuite désassemblés par l'ATPase ClpV ce qui permet de commencer un nouveau cycle de sécrétion. ME : la membrane externe, MI : la membrane interne, PG : le peptidoglycane (Kapitein & Mogk, 2013).

VII.3. Les effecteurs sécrétés par T6SS.

Deux types de substrats de T6SS ont été identifiés. La première classe est représentée par les protéines VgrG évoluées (VgrG qui possèdent un domaine supplémentaire fusionné à l'extrémité C-terminale) de *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Vibrio* et *Burkholderia* (Pukatzki *et al.*, 2007). La position exposée de ces domaines supplémentaires de VgrG assure leur exposition après la perforation de la membrane de l'hôte. Ces domaines peuvent avoir des activités différentes, y compris l'adhésion cellulaire, la dégradation du chitosane, la fixation de l'actine (VgrG1 de *V. cholerae*) et sa modification (VgrG1 d'*A. hydrophila*). Les protéines VgrG évoluées ont donc deux rôles : un structural et un rôle d'effecteur.

La deuxième classe de substrats est représentée par les toxines classiques. Ces toxines n'ont pas de rôle structural et elles ne sont pas nécessaires à l'exportation de Hcp et VgrG (Miyata *et al.*, 2011). Les toxines sont délivrées à l'intérieur des cellules cibles à travers le canal formé par Hcp. Une fois que la paroi est percée, le trimère de VgrG dissocie de tubes formés par Hcp ce qui permet le passage de toxines.

A l'heure actuelle, aucun signal de sécrétion n'a été décrit pour le T6SS. Par contre, il a été démontré chez *R. leguminosarum* que la sécrétion de son substrat RbsB est dépendante de la présence d'une séquence particulière à son extrémité N-terminale (Bladergroen *et al.*, 2003). Les mêmes observations ont été faites chez *V. cholerae* et *P. aeruginosa* (Mougous *et al.*, 2006 ; Pukatzki *et al.*, 2006) et le pathogène de poissons *Edwardsiella tarda* (Rao *et al.*, 2004).

Le diamètre intérieur du hexamère Hcp est compatible avec la taille de petites protéines dans un état replié ou les protéines dans un état partiellement replié (Mougous *et al.*, 2006). Cette hypothèse est cohérente avec l'effet que deux effecteurs, EvpP d'*E. tarda* et Atu4347 d'*A. tumefaciens*, interagissent avec Hcp (Zheng & Leung, 2007 ; Lin *et al.*, 2013). Les études récentes ont démontrés que l'effecteur Tse2 de *P. aeruginosa* interagit et occlut l'hexamère Hcp ce qui peut suggérer que la tube Hcp pourrait jouer un rôle du chaperon pour délivrer les effecteurs dans les cellules d'hôte (Silvermann *et al.*, 2013).

Récemment il a été démontré qu'une autre protéine PAAR est sécrétée dans une façon dépendante de VgrG et cette protéine peut jouer un rôle de connecteur entre VgrG et les effecteurs. Certaines protéines de type PAAR sont fusionnée avec les domaines d'effecteurs putatif. Il est possible que PAAR puisse au repliement de VgrG (Shneider, 2013).

VIII. Le système de sécrétion de type II (T2SS).

VIII.1. Introduction.

Parmi les six systèmes de sécrétion identifiés chez les bactéries à Gram négatif, le T2SS est la seule machinerie capable d'assurer la sécrétion des protéines et même de multimères protéiques sous la forme repliée. La sécrétion se passe en deux étapes. Premièrement, les substrats du T2SS traversent la membrane interne grâce à un de deux systèmes d'exportation : le système Sec qui prend en charge les protéines non repliées ou Tat qui assure la translocation des protéines repliées. Les mécanismes de fonctionnement de translocons Sec et Tat ont été décrits auparavant (Chapitres I.I et I.II). Pour être reconnues par un de ces systèmes d'exportation, les protéines

portent une séquence signal appropriée à l'extrémité N-terminale qui va être clivée pendant l'exportation. Les protéines à sécréter par le T2SS se retrouvent alors dans le périplasme ou elles ont besoin d'être reconnues parmi les autres protéines périplasmiques et prises en charge par la machinerie de T2SS.

VIII.2. Répartition des T2SSs chez les bactéries à Gram négatif.

Le système de sécrétion de type II (T2SS) a été premièrement décrit chez *Klebsiella oxytoca*, où ce système est responsable de la sécrétion d'une enzyme de dégradation de l'amidon, la pullulanase (d'Enfert *et al.*, 1987). Depuis, le T2SS a été largement étudié dans six espèces principales : *Aeromonas hydrophila*, *Dickeya dadantii*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, et *Xanthomonas campestris*. Le T2SS a été majoritairement retrouvé chez γ -protéobactéries, mais aussi chez α et β -protéobactéries, cyanobactéries et Chlamidia. On retrouve le T2SS chez les bactéries pathogènes de l'homme : *V. cholerae*, les souches entérotoxigéniques et entérohémorragiques d'*E.coli* (ETEC et EHEC), *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Legionella pneumophila* et *Yersinia enterocolitica* (Cianciotto *et al.*, 2005). Il est également présent chez les pathogènes des animaux et des poissons : *A. hydrophila* et *A. salmonicida* (Jiang *et al.*, 1992). Plusieurs pathogènes des plantes possèdent aussi un ou plusieurs T2SSs : *D. dadantii*, *Pectobacterium carotovorum*, *X. campestris* et *X. oryzae* (Jha *et al.*, 2005 ; Rajeshwari *et al.*, 2005).

VIII.3. Le système T2SS, l'organisation de l'opéron.

Selon la bactérie considérée, un T2SS complet est codé par 12 à 15 gènes, généralement appelés *gsp* (general secretory pathway) et nommés de A à O, et S (Pugsley *et al.*, 1997). Dans chaque espèce bactérienne, les gènes de T2SS sont souvent appelés différemment (*out* chez *Dickeya*, *eps* chez *Vibrio* etc.) mais les noms de gènes équivalents (de A à O, et S) sont conservés. Les T2SSs de *P. aeruginosa* font une exception à cette règle. L'identité de séquence en acides aminés varie entre 25-40 % pour les composants GspC, L et M et 60-80 % pour GspE, F et G. L'organisation de ces gènes est généralement bien conservée même si chez certaines espèces cette ordre peut être différent (Douzi *et al.* 2012). La majorité des gènes de T2SS sont organisés dans un seul opéron, et certains gènes se chevauchent. Les différences les plus notables dans l'organisation des gènes concernent souvent des gènes situés du côté 5' ou 3' du cluster (Figure 36).

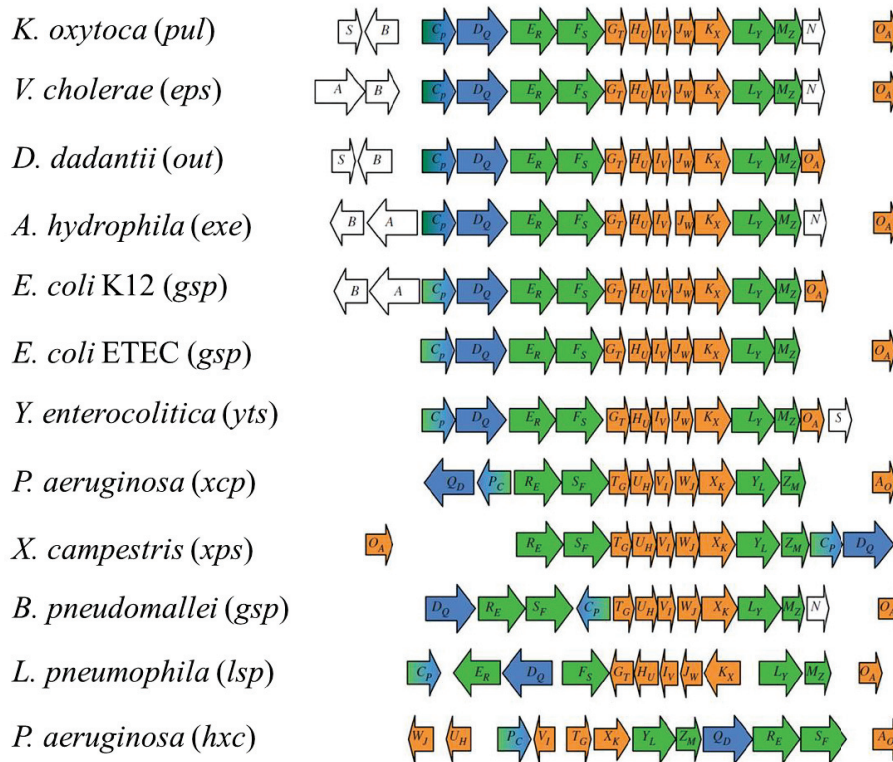


Figure 36. Organisation des gènes de T2SS chez différentes espèces.

Les gènes homologues sont représentés avec les mêmes couleurs. Les noms des gènes de T2SS chez *P. aeruginosa* sont différents de ceux des autres espèces (Douzi *et al.*, 2012).

VIII.4. La localisation et l'assemblage de T2SS.

Une étude réalisée chez *P. aeruginosa*, a estimé que la quantité de machineries de T2SS assemblées peut varier de 50 à 100 par cellule (Brok *et al.*, 1999). Plus récemment, les modalités d'assemblage de T2SS ont été étudiées chez quelques espèces bactériennes en utilisant des composants couplés à la GFP. Cependant, ces résultats ne sont pas toujours cohérents entre eux. Par exemple, les unités de T2SS seront distribuées en spirale et assemblées au centre de la cellule chez *K. oxytoca* et *V. cholerae* mais elles seraient concentrées aux pôles chez *P. aeruginosa* (Lybarger *et al.*, 2009 ; Buddelmeijer *et al.*, 2006 ; Senf *et al.*, 2008). La sécrétine GspD ne serait pas dépendante de la présence d'autres composants du système pour être assemblée et insérée dans la membrane externe (Lybarger *et al.*, 2009). Au contraire, la microscopie à fluorescence a démontré que c'est la sécrétine qui initialise la co-localisation des autres composants du T2SS, OutC, OutL, OutM, OutF et OutE (Buddelmeijer *et al.*, 2009; Lybarger *et al.*, 2009).

Les composants du T2SS sont situés dans les deux membranes et peuvent être séparés en trois parties: 1) les protéines intégrées, ancrées ou associées avec la membrane interne (codées par les gènes *gspC*, *gspL*, *gspM*, *gspF*, *gspE*, représentés en bleu); 2) le pseudopilus (composé de protéines GspGHIJK, en vert) qui semble jouer le rôle d'un piston propulsant des substrats à

travers le pore dans la membrane externe 3) la sécrétine GspD (en marron) qui forme ce pore dans la membrane externe (Figure 37).

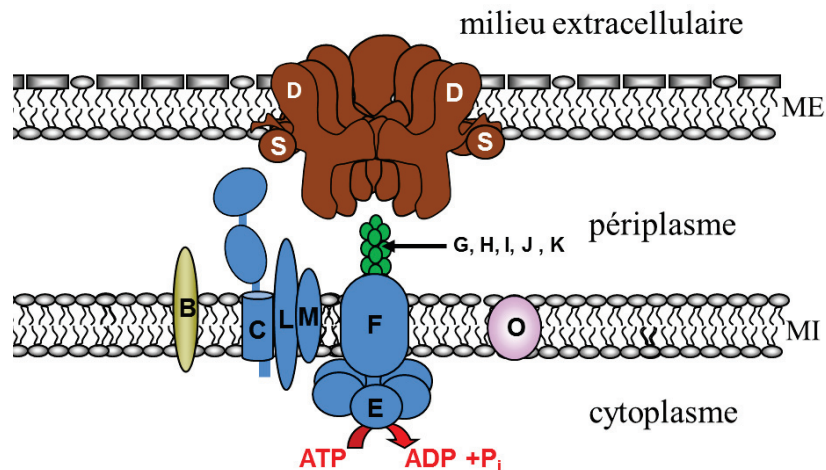


Figure 37. Représentation schématique de T2SS.

Pour atteindre la membrane externe, les monomères de la sécrétine ont besoin de traverser la couche de peptidoglycane. Ce passage serait indépendant du système Bam (Collin *et al.*, 2009). Certaines T2SS possèdent la lipoprotéine GspS, un chaperon spécifique qui protège la sécrétine, et assure son passage à la membrane externe grâce à l'intervention de la voie Lol (Nickerson *et al.*, 2011; Guilvout *et al.*, 2006). Pour certaines sécrétines, la présence de protéines spécifiques GspA et B qui modulent l'organisation du peptidoglycane est nécessaire (Strozen *et al.*, 2011; Li & Howard, 2010). Les protéines de la membrane interne, OutC, OutL, OutM, OutF et OutE semblent suivre la sécrétine pour former une machinerie complète (Buddelmeijer *et al.*, 2009; Lybarger *et al.*, 2009). La formation de pseudopilus quant à elle, serait amorcée par les interactions entre les pseudopilines mineures GspHIJK (Cisneros *et al.*, 2012) suivie d'une polymérisation de la pseudopiline majeure GspG grâce aux changements conformationnels de GspL et à l'énergie fournie par l'ATPase GspE (Gray *et al.*, 2011).

VIII.4. Les composants du T2SS.

VIII.4.1. La sécrétine GspD.

La protéine GspD fait partie d'une superfamille des sécrétines, qui regroupe les sécrétines du T2SS, du T3SS (YscC d'*Yersinia*, InvG de *S. typhimurium*), les sécrétines des phages filamenteux pIV et des pili de type IV T4P (PilQ) (Korotkov *et al.*, 2011a) (Figure 38). Dans tous ces systèmes, les sécrétines jouent un rôle similaire : elles forment un pore dans la membrane externe à travers lequel des macromolécules peuvent être transloquées. Ce pore est un

anneau formé par 12 à 15 protomères de la sécrétine. Le pore de la sécrétine PulD de *K. oxytoca* est constitué de 12 protomères (Chami *et al.*, 2005). Le diamètre du pore des sécrétines estimé par microscopie électronique serait de 5 nm (PilQ, YscC) (Collins *et al.*, 2001 ; Burghout *et al.*, 2004b) à 10 nm (XcpQ et YscC) (Brok *et al.*, 1999 ; Burghout *et al.*, 2004b ; Kowal *et al.*, 2013).

Les comparaisons de séquences de différentes sécrétines et les résultats de protéolyse de PulD et XcpQ ont permis d'identifier deux domaines principaux : le domaine C-terminal, bien conservé et résistant aux protéases, et le domaine N-terminal, variable et sensible aux protéolyses (Genin & Boucher, 1994 ; Guilvout *et al.*, 1999). Le domaine C-terminal (300 à 400 résidus) est bien conservé dans toute la famille des sécrétines (Brok *et al.*, 1999).

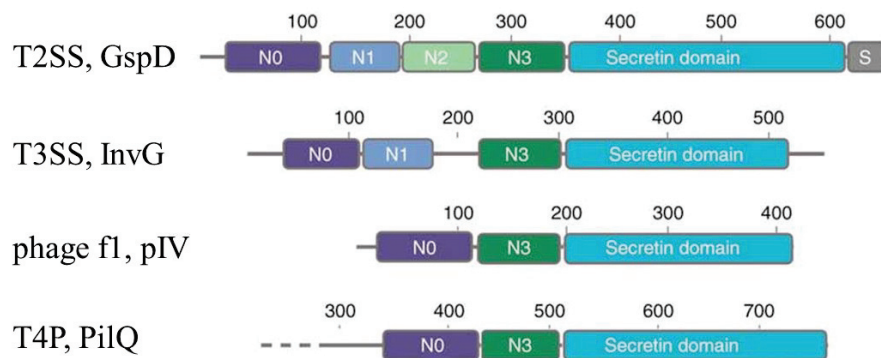


Figure 38. Organisation générale de différentes sécrétines (D'après Reichow *et al.*, 2010).

Il a été suggéré que le domaine C-terminal serait composé de brins β transmembranaires (Pugsley *et al.*, 1993 ; Bitter *et al.*, 1998). Cependant, l'analyse par dichroïsme circulaire a montré que ce domaine ne contient que 27 % de brins β (Chami *et al.*, 2005) ce qui n'est pas habituel pour des protéines intégrales de la membrane externe (Koebnik *et al.*, 2000). Certaines sécrétines possèdent aussi un petit domaine S (30 à 70 résidus) situé à leur extrémité C-terminale. Le domaine S représente une région d'interaction avec la pilotine GspS (Shevchik & Condemine, 1998, Hardie *et al.*, 1999).

Le domaine N-terminal constitue une large partie périplasmique de la sécrétine, qui pourrait interagir avec les autres composants du T2SS et/ou avec les protéines à sécréter. Il est constitué de quatre sous-domaines : N0, N1, N2 et N3 (Figure 38). La structure des domaines N0, N1 et N2 de GspD d'*E. coli* ETEC, co-cristallisés avec un nanobody a été résolue par diffraction aux rayons X (Korotkov *et al.*, 2009). Dans cette structure, les trois sous-domaines périplasmiques sont organisés en deux lobes (Figure 39A). Un lobe compact composé des sous-domaines N0 et N1 et un autre composé du sous-domaine N2. Le sous-domaine N0 interagit avec N1 grâce à deux brins β antiparallèles : β_3 de N0 et β_6 de N1 (Figure 39A et 39B). Le sous-domaine N0 est

composé de deux hélices- α entourées d'un côté, par un feuillet β mixte composé de trois brins et d'un autre côté, par un autre feuillet β composé de deux brins antiparallèles (Figure 39B). Ce type de repliement est proche des domaines des récepteurs de TonB (Figure 39C) (Brillet *et al.*, 2007). Une similarité structurale observée entre N0 et FpvA (le récepteur de TonB) a permis de suggérer leur similarité fonctionnelle probable. Notamment, dans la structure de GspD le brin $\beta 2$ de N0 n'est pas impliqué dans les interactions entre les sous-domaine N0 et N1, il reste donc accessible et, par analogie avec FpvA, ce brin β pourrait interagir avec un partenaire externe (Korotkov *et al.*, 2009a). Une étude structurale récente a permis de démontrer que le sous-domaine N0 de la sécrétine GspD d'*E. coli* forme une sorte d'hélice composée de 12 sous-unités par tour (Korotkov *et al.*, 2013). Le brin $\beta 2$ d'une sous-unité, la boucle entre $\beta 2/\beta 3$, le brin $\beta 5$ et la boucle entre $\beta 4/\beta 5$ sont impliqués dans l'interaction avec hélice $\alpha 2$ d'une autre unité. Les sous-domaines N1 et N2 ont le même type de repliement, ils sont composés de deux ou trois hélices α et d'un feuillet β de trois brins (Figure 39A, 39B).

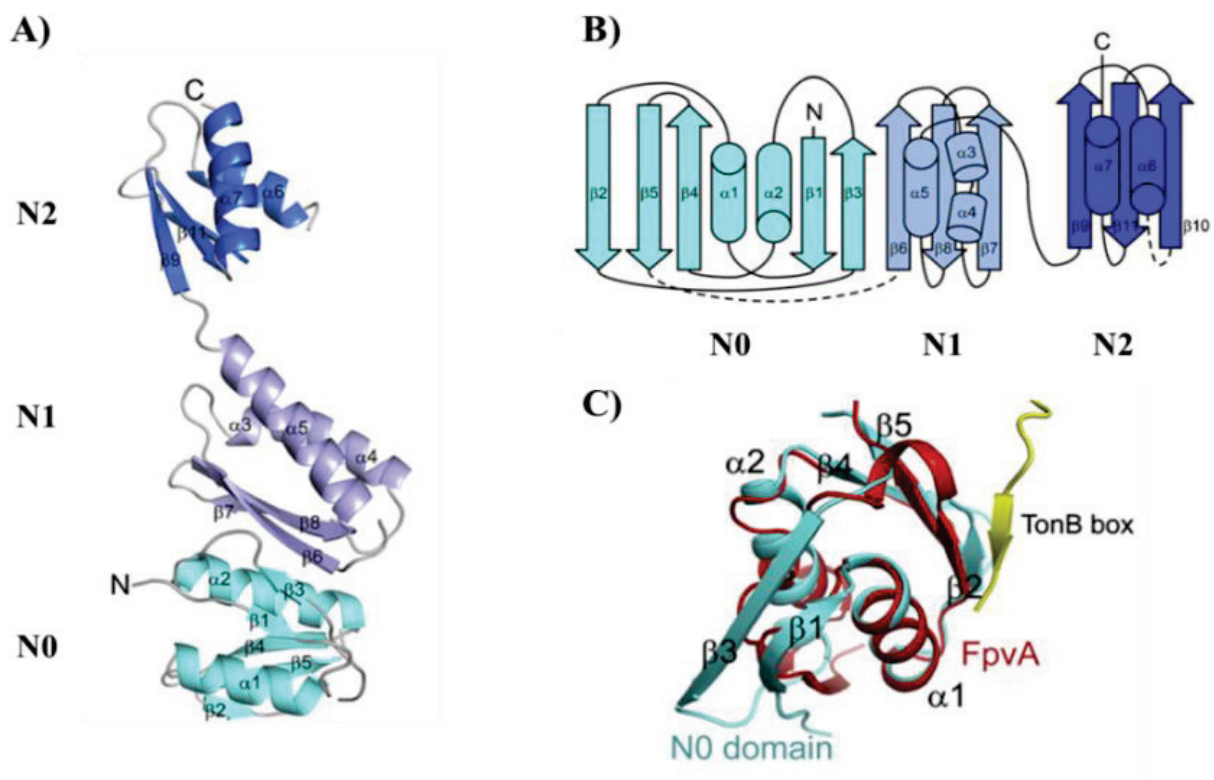


Figure 39. Structure du domaine N-terminal de GspD d'*E. coli* ETEC.

A) Structure de sous-domaines N0, N1, N2 (3EZJ). B) Représentation schématisée des sous-domaines N0, N1, N2. C) Superposition du domaine N0 et de la protéine FpvA (le récepteur de TonB) (Korotkov *et al.*, 2009a).

Une étude structurale plus récente a démontré que la sécrétine XcpQ de *P. aeruginosa* possède un repliement très similaire à celui de GspD (Van der Meeren *et al.*, 2013) même si les

séquences de XcpQ et GspD sont assez différentes et les deux secrétines appartiennent à des sous-familles éloignées (Dunstan *et al.*, 2013). Les structures des sous-domaines N0, N1 et N2 de XcpQ et GspD sont très proches, avec des valeurs de RMSD de 0.64 Å pour N0, 1.66 Å pour N1 et 1.01 Å pour N2 (Figure 40). Notamment, l'interface entre N0 et N1 est aussi conservée entre XcpQ et GspD et comprend $\beta 3$ de N0 et $\beta 6$ de N1. La différence principale entre XcpQ et GspD réside dans la position du domaine N2. Sur la structure de XcpQ ce domaine est positionné plus près de N1 en interaction avec ce domaine. Dans GspD, une telle interface entre N1 et N2 n'est pas possible à cause de la co-cristallisation avec les nanobodies (Figure 40).

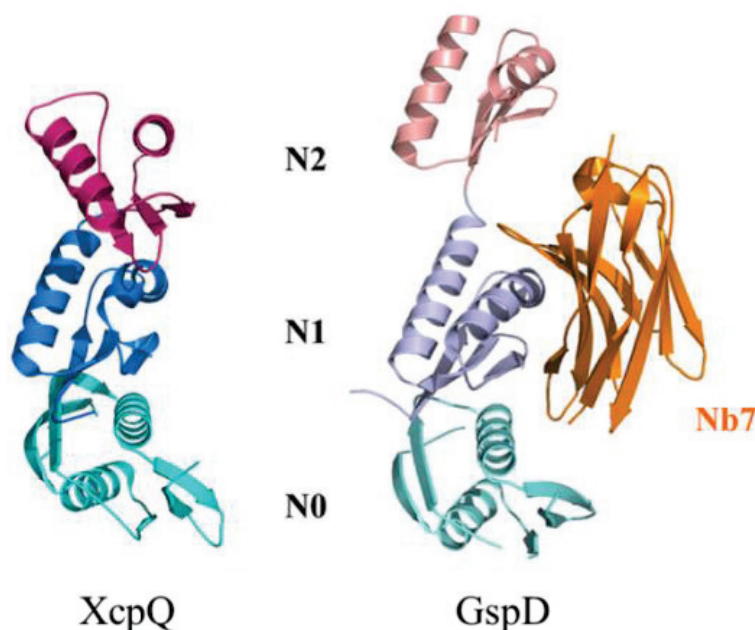


Figure 40. Structures des domaines N-terminaux des structures de XcpQ de *P. aeruginosa* (4E9J) et GspD d'*E. coli* (3EZJ).

La secrétine EscC du T3SS d'*E. coli* EPEC possède une organisation générale similaire à celle des secrétines du T2SS (Figure 41). Elle possède notamment les sous-domaines N0 et N1 (Spreter *et al.*, 2009) (Figure 38). Cependant, même si le repliement des sous-domaines N0 et N1 de GspD et EscC sont très similaires et ces sous-domaines isolés se superposent parfaitement (Figure 41A pour N0, 41B pour N1), leur orientation relative est très différente dans GspD et EscC et l'interface entre N0 et N1 dans EscC est très différente de celle observée dans les secrétines du T2SS, GspG et XcpQ. (Figure 41B).

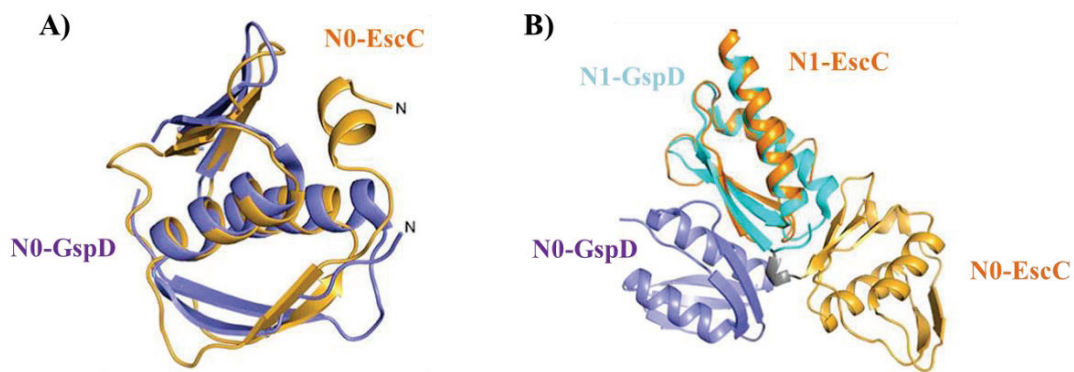


Figure 41. Superpositions des sous-domaines N0/N1 de GspD et d'EscC d'*E. coli* EPEC.

A) Superposition de sous-domaines N0 de GspD (violet, 3EZJ) et d'EscC (orange, 3GR5). B) Superposition des sous-domaines N0 (violet) et N1 (bleu clair) de GspD et N0/N1 d'EscC (orange).

Structure du pore de la sécrétine dans la membrane externe.

La formation des homomultimères de sécrétine a été premièrement démontrée par les techniques du pontage chimique et filtration sur gel (Kazmierczak *et al.*, 1994, Chen *et al.*, 1996). Les analyses par microscopie électronique ont permis de démontrer que 12 à 14 protomères de sécrétine forment des homomultimères avec une cavité centrale d'un diamètre de 50 à 90 Å selon les espèces (Nouwen *et al.*, 2000 ; Burghout *et al.*, 2004). Vue la taille du pore, son ouverture et sa fermeture doivent être strictement régulées pour éviter la sortie des protéines périplasmiques. L'analyse par microscopie électronique de la sécrétine PulD de *K. oxytoca* (Nouwen *et al.*, 2000) et pIV du phage filamenteux (Opalka *et al.*, 2003) ont démontré la présence d'un « bouchon » au centre du pore. Au début, on a pensé que cette structure était formée par le domaine N-terminal, mais les études plus récentes ont indiqué que cette structure est formée par le domaine C-terminal (Chami *et al.*, 2005). La reconstitution tridimensionnelle du dodécamère de PulD montre qu'il est constitué de deux anneaux. Un anneau ouvert est positionné dans la membrane externe et lié par des connections faibles au deuxième anneau, situé lui-même dans le périplasme (Figure 42).

L'entrée du pore du côté périplasmique est ouverte, par contre une densité occupe le centre du canal (Figure 42D). Chami *et al.* (2005) ont proposé une hypothèse suivante : le chargement de la protéine à sécréter peut déplacer le « bouchon » au centre du pore et entraîner la formation d'un canal continu à travers du pore pour assurer la translocation du substrat (Chami *et al.*, 2005).

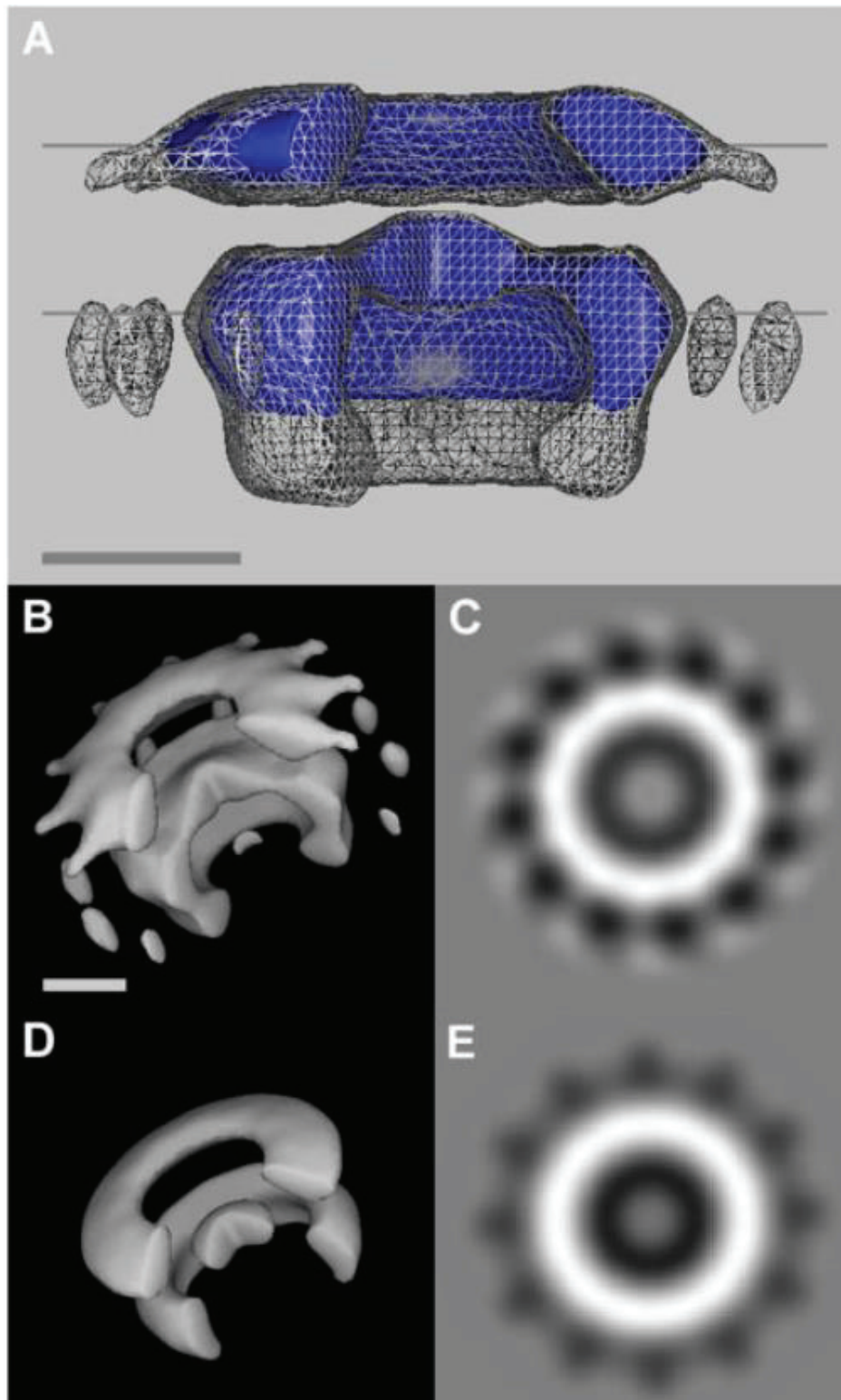


Figure 42. Reconstitution tridimensionnelle de la sécrétine PulD de *K. oxytoca*.

(A) Le domaine résistant à la protéolyse (en bleu) correspond au domaine C inséré dans la membrane externe. Le domaine sensible à la protéolyse (en gris) correspond au domaine N et domaine S (petites masses latérales). (B) Vues en perspective du multimère de PulD entier (en haut) et du domaine résistant à la protéolyse (en bas). (C) Vues axiales correspondantes. (Chami *et al.*, 2005)

Une étude plus récente de GspD de *V. cholerae* réalisée par la cryo-microscopie électronique a permis de déterminer la longueur (du périplasma au milieu extracellulaire : 200 Å) et le diamètre (155 Å) du dodécamère formé par cette sécrétine (Reichow *et al.*, 2010). L'entrée du vestibule périplasmique est environ de 75 Å, suivie d'une zone de resserrement (Figure 43) Le vestibule périplasmique est séparé de la chambre extracellulaire par une barrière périplasmique. Le diamètre de la chambre extracellulaire a été estimé à 100 Å, elle est séparée du milieu extracellulaire par une barrière extracellulaire (Figure 43).

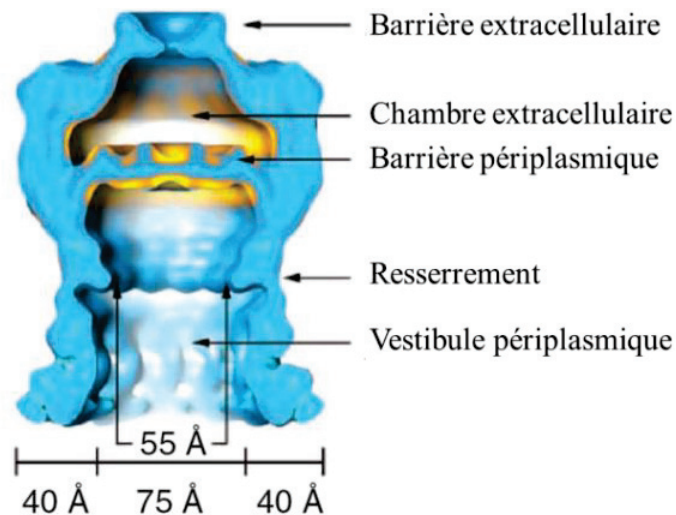


Figure 43. Structure de la sécrétine GspD de *V. cholerae* dans un état « fermé ».

La sécrétine serait composée de deux compartiments séparés l'un de l'autre par la barrière périplasmique et du milieu extérieur par la barrière extracellulaire (Reichow *et al.*, 2010)

Un modèle, regroupant la structure cristallographique des domaines N0, N1, N2 et la prédiction de N3 de GspD (Korotkov *et al.*, 2009) ainsi que le modèle 3D du dodécamère formé par la sécrétine, a été proposé (Figure 44) (Reichow *et al.*, 2010). La protéine sécrétée, l'hétérohexamère de la toxine cholérique a été placée dans le vestibule périplasmique.

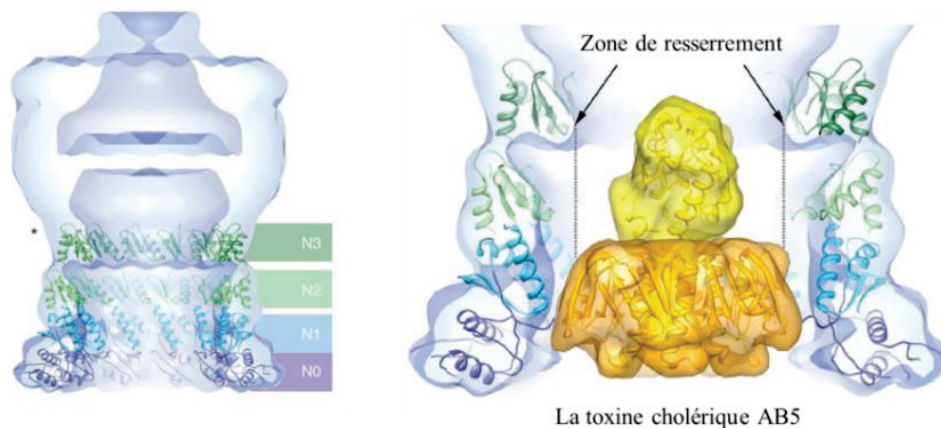


Figure 44. Superposition des structures 3D des domaines N0, N1, N2 et N3 (prédiction) de GspD d'*E. coli* avec le modèle 3D de la sécrétine dans son état «fermé».

(A) Vue d'ensemble. (B) Insertion dans ce modèle de la structure de la toxine cholérique AB5, sécrétée par le T2SS de *V. cholerae*. (Reichow *et al.*, 2010)

Il a été suggéré que l'anneau formé par les sous-domaines N3 représente le site de resserrement (Figure 43, Figure 44). Par conséquent, les études réalisées avec plusieurs sécrétines ont mis en évidence des caractéristiques communes : un arrangement de 12 à 15 protomères, un large vestibule avec ouverture d'un côté et barrière périplasmique de l'autre (Korotkov *et al.*, 2011). Néanmoins, le mécanisme de l'ouverture de ce canal lors de sécrétion reste à identifier. Cette ouverture pourrait être initiée par les contacts avec les protéines à sécréter et/ou les autres composants du T2SS. Les interactions directes de la sécrétine avec les protéines sécrétées ont été démontrées : entre la pectate lyase PelB et OutD de *D. dadantii* (Shevchik *et al.*, 1997) ; entre l'entérotoxine LT B5 et le domaine périplasmique de GspD d'*E. coli*, entre la toxine cholérique et le domaine périplasmique de la sécrétine de *V. cholerae* (Reichow *et al.*, 2010, Reichow *et al.*, 2011) et entre les exoprotéines de *P. aeruginosa* et XcpQ (Douzi *et al.*, 2011). Cependant, l'interaction du substrat avec la sécrétine ne semble pas être suffisante pour permettre l'ouverture du pore. Ces résultats corroborent des données antérieures, où la présence de la pullulanase dans le mélange liposome/PulD n'a pas affecté la conductance du canal de la sécrétine (Nouwen *et al.*, 1999). D'autre part, les interactions entre la sécrétine et certains autres composants du système ont été démontrées : avec GspG (Lee *et al.*, 2005), avec le complexe GspK-GspI-GspJ (Reichow *et al.*, 2010), GspC (Korotkov *et al.*, 2006; Login *et al.*, 2010 ; Douzi *et al.*, 2011) et GspB (Condemine & Shevchik, 2000; Ast *et al.* 2002; Strozen *et al.*, 2011). Ces interactions peuvent jouer un rôle direct ou indirect dans la régulation de l'ouverture /fermeture du pore de la sécrétine.

Le mode d'organisation des protomères de la sécrétine dans le canal multimérique est aussi une question de controverse. Dans le modèle qui place la structure cristallographique dans la

reconstitution 3D du pore, une symétrie de type C12 a été proposée (Reichow *et al.*, 2010). C'est aussi cohérent avec l'organisation des domaines N0 observée dans les mailles des cristaux (Korotkov *et al.*, 2013). Cependant, les études réalisées *in vivo* suggèrent que l'unité fonctionnelle de la sécrétine serait un dimère. Le pore de la sécrétine serait donc organisé en hexamère de dimères avec une symétrie de C₆ (Van der Meeren *et al.*, 2013). Le même type symétrie a été proposé pour la sécrétine BfpB de T4P de *E. coli* (Lieberman *et al.*, 2012). Les études réalisées en partie dans le cadre de cette thèse confirment cette hypothèse (Wang *et al.*, 2012).

VIII.4.2. GspS, la pilotine.

Les sécrétines du T2SS sont synthétisées avec une séquence signal à l'extrémité N-terminale leur permettant d'être exportées par le système Sec. Ensuite, la translocation des sécrétines à partir de la membrane interne au travers du périplasme jusqu'à la membrane externe nécessite l'intervention de certaines protéines ou systèmes spécialisés. Le système Omp85/BamA qui est responsable de l'assemblage des protéines en tonneau-β dans la membrane externe, est aussi essentiel pour l'adressage et l'insertion de la sécrétine PilQ du T4P (Voulhoux *et al.*, 2003). Cependant, l'assemblage de la sécrétine PulD de *K. oxytoca* dans la membrane externe ne dépend pas de ce système (Collin *et al.*, 2007). Il a été démontré que dans certains T2SS, l'adressage, l'insertion et l'assemblage de la sécrétine dans la membrane externe sont dépendants d'une petite lipoprotéine appelée la pilotine GspS. La pilotine utilise la voie Lol pour atteindre la membrane externe. Les pilotines ont été décrites dans divers T2SSs : chez *K. oxytoca*, PulS (Hardie *et al.*, 1996), et *D. dadantii*, OutS (Shevchik *et al.*, 1997), chez *E. coli* EHEC, EtpO et ETEC, YghG (Strozen *et al.*, 2012) et chez *V. cholerae*, AspS (Dunstan *et al.*, 2013).

Les pilotines de la famille OutS/PulS ont été étudiées plus en détail (Hardie *et al.*, 1996 ; Shevchik & Condemine, 1998). Ces études ont montré que l'absence de pilotine, entraînait une diminution du nombre de dodécamères et de la quantité globale de sécrétine et une accumulation de monomères de sécrétine. De plus, en absence de la pilotine, la sécrétine se retrouve dans la membrane interne (Guilvout *et al.*, 2006). La pilotine OutS de *D. dadantii* possède à son extrémité N-terminale une séquence (³LAAC⁺) qui est le site spécifique de clivage des lipoprotéines par la peptidase LspA. La cystéine libérée par ce clivage sera ensuite lipidée ce qui permettra le recrutement de la pilotine par le système Lol, qui assure le transport des lipoprotéines à la membrane externe (Shevchik & Condemine, 1998).

La structure d'OutS de *D. dadantii* (Gu *et al.*, 2012b) ainsi que celle de deux autres pilotines de la même famille, PulS de *K. oxytoca* (Tosi *et al.*, 2011) et GspS d'*E. coli* EHEC (Korotkov *et al.*, 2013) a été récemment résolue (Figure 45). Ces pilotines adoptent le même

repliement qui est constitué d'un paquet de quatre hélices α . Les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment un « épingle à cheveux », tandis que les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ sont courbées et enveloppent cette « épingle à cheveux » (Figure 45A) (Gu *et al.*, 2012a). Un pont disulfure, conservé dans OutS, PulS et GspS, fixe ensemble les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ et il est nécessaire pour stabiliser la structure de la pilotine.

La structure de pilotine AspS de *V. cholerae* est différente de celles de famille OutS-PulS (Figure 45D) (Dunstan *et al.*, 2013). Elle est présentée par un feuillet composé de cinq brins β et quatre hélices α (Figure 45D).

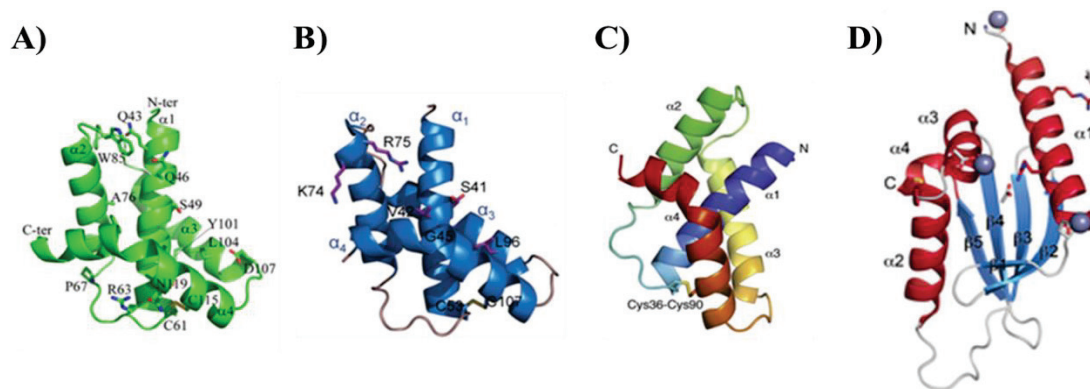


Figure 45. Structures de pilotines.

A) OutS de *D. dadantii*, 3UTK (Gu *et al.*, 2012a). B) PulS de *K. oxytoca*, 4A56 (Tosi *et al.*, 2011) C) GspS d'*E. coli* EHEC, 3SOL (Korotkov *et al.*, 2013), D) AspS de *V. cholerae* (Dunstan *et al.*, 2013).

La pilotine interagit directement avec une courte région située à l'extrémité C-terminale de la sécrétine, appelée le domaine S. Les études récentes utilisant des approches biophysiques variées ont permis de démontrer que le domaine S de la sécrétine n'est pas structuré, mais il se replie en hélice α en contact avec la pilotine (Nickerson *et al.*, 2011 ; Gu *et al.*, 2012a ; Rehman *et al.*, 2013). L'interaction se fait en deux étapes. Un faible lien unirait la sécrétine et la pilotine lors du rapprochement, puis deviendrait plus fort alors que la fixation se réalise, unissant les deux protéines en un complexe. La structure de la pilotine OutS en complexe avec le peptide C-terminal de la sécrétine OutD a été résolue très récemment (Figure 46) (Rehman *et al.*, 2013).

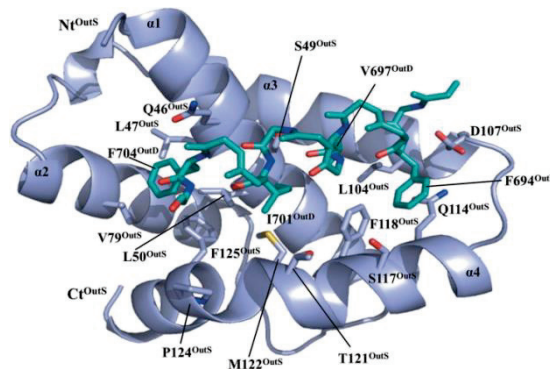


Figure 46. Structure de la pilotine OutS en complexe avec le peptide C-terminal de la sécrétine OutD.

Le peptide C-terminal de la sécrétine OutD est indiqué en bleu, la pilotine OutS, en violet (Rehman *et al.*, 2013).

Un modèle d'adressage de la sécrétine par la pilotine impliquant le système Lol a été proposé (Figure 47) (Collin *et al.*, 2011 ; Korotkov *et al.*, 2012).

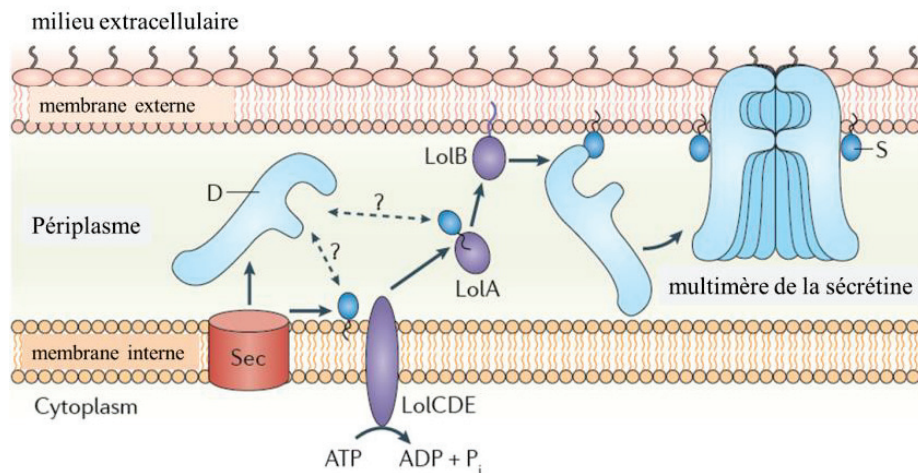


Figure 47. Mécanisme possible du fonctionnement de la pilotine.

La pilotine OutS (un ovale bleu) interagit avec un monomère d'OutD (un bleu clair avec une lettre D) et assure son adressage à la membrane externe par la voie Lol (les protéines LolABCDE sont indiquées en violet).

Chez *E. coli* ETEC, en absence de la pilotine YghG (GspS β), la majorité de GspD β est dégradée ou localisée dans la membrane interne sous la forme de monomère. Au contraire, en présence de YghG, la sécrétine GspD β est correctement localisée dans la membrane externe et forme des multimères fonctionnels (Strozen *et al.*, 2012). Par contre, la pilotine YghG n'a aucune influence sur l'assemblage de la sécrétine GspD α d'un autre système de type II d'*E. coli* qui quant à lui, possède sa propre pilotine appelée EtpO. Une étude récente a démontré que *E. coli* possèdent deux types de T2SS ayant chacun sa propre sécrétine, GspD(α) et GspD(β), et

les pilotines appropriées, de type PulS/OutS/EtpO et YghG/AspS, respectivement (Dunstan *et al.*, 2013).

Certains T2SS ne possèdent aucune pilotine ou les gènes correspondants n'ont pas été identifiés. Par ailleurs, certaines sécrétines sont elles-mêmes des lipoprotéines et n'ont pas besoin d'assistance d'une pilotine pour être adressées à la membrane externe. Par exemple, la sécrétine HxcQ du deuxième T2SS de *P. aeruginosa* possède une longue région à l'extrémité N-terminale avec un site de lipidation spécifique de lipoprotéines (Viarre *et al.*, 2009). Dans le cas de la sécrétine XcpQ du premier T2SS de *P. aeruginosa*, une protéine périplasmique serait nécessaire à l'adressage de XcpQ dans la membrane externe (Seo *et al.*, 2009). Par ailleurs, une étude récente a évoqué l'existence d'une pilotine « classique », une lipoprotéine de la famille YghG/AspS qui pourrait servir pour les deux sécrétines de *P. aeruginosa* (Dunstan *et al.*, 2013).

Il faut aussi mentionner que des pilotines de type lipoprotéine ont été identifiées pour les sécrétines de T3SS et de pili de type IV. Elles adoptent les repliements très distants et qui sont aussi différents de ceux de pilotines OutS/PulS et YghG/AspS de T2SS. La pilotine MxiM de T3SS chez *Shigella flexneri* a un repliement général formé de 4 hélices α et possède comme particularité, un feuillet β ouvert ou fissuré qui forme un complexe avec 18 résidus C-terminaux de la sécrétine partenaire MxiD (Okon *et al.*, 2008). La pilotine PilW/PilF du T4P de *Neisseria meningitidis* ou *Pseudomonas aeruginosa*, possède une architecture différente de celle de MxiM, notamment six séries d'hélices α mais agit d'une manière semblable (Trindade *et al.*, 2008). Il est donc intéressant de voir que malgré une fonction équivalente, les pilotines issues de systèmes variés, tels que T2SS, T3SS et T4PS, ont des différences profondes de structure. Ceci pourrait représenter un exemple de l'évolution convergente des structures protéiques variées vers la même fonction biologique.

VIII.4.3. La protéine GspC.

GspC et la sécrétine GspD sont les deux composants du T2SS qui sont impliqués dans la spécificité du système. Les études génétiques réalisées avec quelques espèces possédant les T2SSs proches comme *D. dadantii*, *P. carotovorum*, ou encore *K. oxytoca* ont démontré que tous les gènes du système peuvent être échangés entre ces bactéries sauf GspC et GspD (Lindeberg *et al.*, 1996 ; Possot *et al.*, 2000). Les mêmes conclusions ont été faites suite aux expériences réalisées chez *P. aeruginosa* et *P. alcaligenes* (de Groot *et al.*, 2001), ce que indique que GspC et GspD sont les porteurs de la spécificité du système. D'autres études ont démontré que GspC et GspD interagissent directement avec les protéines sécrétées (Bouley), suggérant un rôle direct de ces deux composants dans la reconnaissance et le recrutement de substrats de sécrétion.

VIII.4.3.1. Description générale.

GspC est une protéine bitopique de la membrane interne. Elle est composée d'une courte région cytoplasmique, à l'extrémité N-terminale, suivi d'un segment transmembranaire (TMS) et d'une large région périplasmique (Thomas *et al.*, 1997). La protéine GspC est active sous forme dimérique. Il a été démontré que la dimérisation de GspC se fait grâce au segment transmembranaire (TMS). Ainsi, cette partie représente non seulement un ancrage dans la membrane interne, mais joue un rôle important dans les fonctions de la protéine GspC (Login & Shevchik, 2006).

La partie périplasmique est composée d'une région bien conservée, appelée le domaine HR (homology region) et de la partie C-terminale qui varie chez les différents GspC et peut contenir un domaine PDZ (chez *V. cholerae* et *D. dadantii*) ou un domaine "coiled-coil" (chez *P. aeruginosa* et *P. alcaligenes*) (Gerard-Vincent *et al.*, 2002) (Figure 48). Dans certaines autres GspC, cette région C-terminale est absente, comme dans la protéine HxcP du deuxième T2SS de *P. aeruginosa* (Peabody *et al.*, 2003) ou SttC du deuxième T2SS de *D. dadantii* (Ferrandez & Condemine, 2008). Le domaine coiled-coil (CC) de XcpP n'est pas indispensable au fonctionnement du système car le mutant XcpP Δ CC reste fonctionnel (Bleves *et al.*, 1999). De plus, ce domaine peut être remplacé par le domaine PDZ d'OutC (Gérard-Vincent *et al.*, 2002). De même, en absence du domaine PDZ d'OutC de *D. dadantii*, certains substrats sont bien sécrétés tandis que la sécrétion des pectate lyases est complètement abolie (Bouley *et al.*, 2001). Chez *D. dadantii*, la sécrétion de certaines exoprotéines (Cel5 et PemA) n'est pas affectée par la délétion du domaine PDZ d'OutC. Par contre, l'absence de ce domaine abolit la sécrétion de PelD, PelE, PelL, PelB, PelC et RhiE, la sécrétion de la pectate lyase PelI est affectée à 50-80 %. Les mêmes résultats ont été obtenus quand le domaine PDZ de *D. dadantii* a été remplacé par le domaine PDZ de *P. carotovorum* (Bouley *et al.*, 2001). Ceci montre que le domaine PDZ assure le rôle de gardien de spécificité pour certaines exoprotéines chez *D. dadantii*. Cependant, les autres substrats sont indépendants ou peu-dépendants du domaine PDZ. Cependant, aucune interaction directe n'a été mise en évidence entre les exoprotéines et le domaine PDZ de GspC. Récemment, une interaction entre la région périplasmique de GspC (qui ne possède pas le domaine PDZ) et les exoprotéines a été démontrée par résonance des plasmons de surface chez *P. aeruginosa* (Douzi *et al.*, 2011).

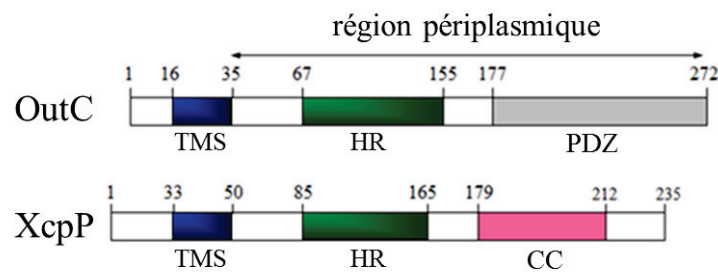


Figure 48. Représentation schématique des protéines OutC de *D. dadantii* et XcpP de *P. aeruginosa*.

VIII.4.3.2. Le domaine PDZ.

Les domaines PDZ ont été nommés d'après les trois protéines dans lesquelles ce type de domaine a été premièrement caractérisé (PSD-95, Disc-large, ZO-1). Chez les eucaryotes, les domaines PDZ sont très fréquents. Ils sont impliqués dans des interactions protéine-protéine et notamment, dans la signalisation cellulaire (Pallen & Ponting, 1997). Les domaines PDZ contiennent d'une centaine de résidus et ont une forme globulaire. La structure du domaine PDZ classique est composée de six brins- β (β A à β F) et deux hélices- α (α A et α B). Le site d'interaction avec le substrat est formé par le brin- β B et l'hélice- α B. Habituellement, la partie C-terminale du substrat se fixe comme un brin- β supplémentaire et antiparallèle à β B (Figure 49). Le motif conservé Gly-Leu-Gly-Phe (GLGF) est localisé dans la boucle entre les brins β A et β B. Il est impliqué dans la formation des liaisons hydrogènes avec le groupement carboxyle du substrat, appelé CBL (carboxylate binding loop) (Harris & Lim, 2001).

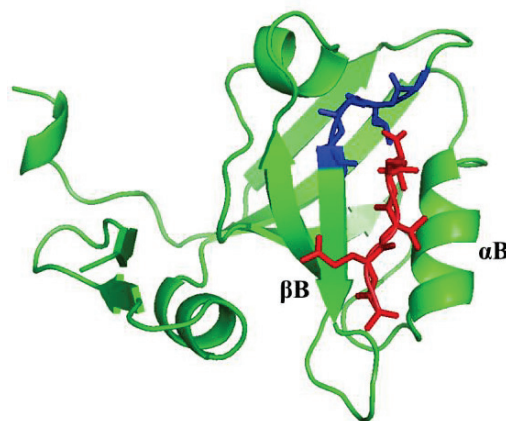


Figure 49. Structure du domaine PDZ3 de la protéine PSD95 en complexe avec son substrat.

Le domaine PDZ est représenté en vert avec le motif GLGF (CBL) en bleu, le substrat en rouge (1BE9) (Doyle *et al.*, 2003).

Chez les bactéries, les domaines PDZ sont moins répandus. Ils sont notamment présents chez les protéases de la famille HtrA/DegP (Clausen *et al.*, 2002). Les protéines de cette famille

possèdent une quantité variable de domaines PDZ. Par exemple, chez *E. coli* : les protéines DegP et DegQ possèdent deux domaines PDZ, et la protéine DegS, un seul (Kim *et al.*, 2005). La structure de DegP a été résolue par cristallographie aux rayons X (Krojer *et al.*, 2002). Cette protéine possède un domaine à activité protéolytique et deux domaines PDZ. DegP forme des hexamères avec les domaines protéolytiques placés dans la cavité centrale et les domaines PDZ tournés vers l'extérieur. L'hexamère de DegP existe sous les deux formes : ouverte et fermée (Ortega *et al.*, 2009) (Figure 50).

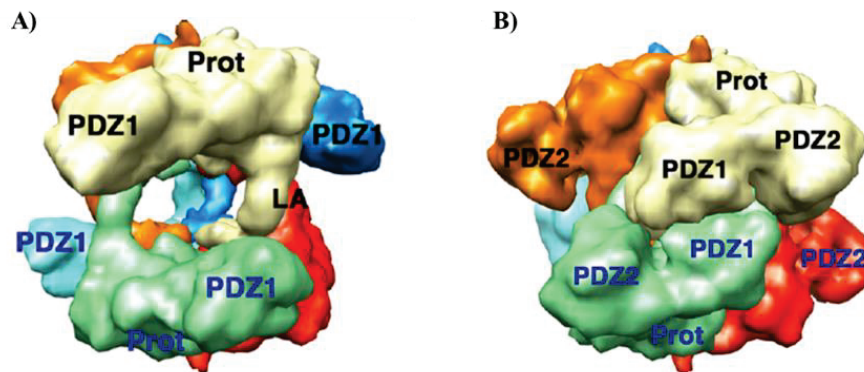


Figure 50. Deux formes de l'hexamère formé par DegP.

A) Forme ouverte. B) Forme fermée. Chaque monomère de DegP est représenté par une couleur différente (Ortega *et al.*, 2009).

Les mouvements des domaines PDZ sont impliqués dans la régulation de l'ouverture/fermeture de la cavité centrale de DegP grâce à la reconnaissance du substrat (Ortega *et al.*, 2009). Dans l'état fermé le site de fixation du substrat du domaine PDZ2 est bloqué par la boucle située entre deux domaines PDZ. Cette interaction affecte la fixation de l'extrémité C-terminale du substrat et bloque l'entrée des substrats dans la cavité interne. Ainsi, les domaines PDZ jouent un rôle important dans la régulation du fonctionnement de DegP.

Le domaine PDZ a été aussi retrouvé chez certaines protéines GspC. La structure du domaine PDZ d'EpsC de *V. cholerae* a été résolue par cristallographie aux rayons X (Korotkov *et al.*, 2006). Deux dérivés d'EpsC d'une taille différente ont été étudiés : la version courte du domaine PDZ, s-PDZ, contenant les résidus 219-305 et la version longue, l-PDZ, contenant les résidus 201-305 (Korotkov *et al.*, 2006). La version s-PDZ adopte un repliement classique, caractéristique des domaines PDZ : 6 brins β (β A- β F) entrecoupés par 2 hélices α (α A et α B) (Figure 51 A). Cependant, la version longue l-PDZ possède une hélice α supplémentaire et présente quelques autres différences notables avec la version courte (Figure 51 B). Notamment, la superposition des deux structures montre que la position de l'hélice α B est différente dans les deux structures. Il est donc possible que le domaine PDZ change de conformation lors de l'interaction avec les protéines partenaires et que les deux structures observées présentent deux

conformations fonctionnelles du PDZ (Figure 51 C). Dans des expériences de cristallogénèse, la co-cristallisation de s-PDZ avec une hélice αA issue d'une autre molécule PDZ a été détectée (Figure 51 D). Les domaines PDZ de la famille GspC ne contiennent pas le motif GLGF qui est impliqué dans la fixation du substrat par les domaines PDZ classiques chez les eucaryotes (Harris & Lim, 2001). Dans la structure présentée sur Figure 51 D, l'hélice $\alpha 2$ occupe la place de la boucle GLGF, ce qui explique pourquoi la fixation d'un peptide C-terminal n'est pas possible par le PDZ de GspC (Korotkov *et al.*, 2006).

Les domaines "coiled-coil" retrouvés chez certaines GspC, sont composés de deux ou plusieurs hélices- α , parallèles ou antiparallèles. Ces domaines (comme les domaines PDZ) sont aussi bien connus pour être impliqués dans les interactions protéine-protéine (Burkhard *et al.*, 2003).

Le domaine PDZ est indispensable pour la sécrétion de certains substrats chez *D. dadantii* (PelD, PelE, PelL, PelB et PelC) et pas important pour les autres (Cel5 et PemA). La sécrétion de la pectate lyase PelI est affectée en absence du domaine PDZ. Le même phénomène est observé dans le cas du remplacement du domaine PDZ de *D. dadantii* par le domaine PDZ de *P. carotovorum* (Bouley *et al.*, 2001). Ainsi, le domaine PDZ détermine la spécificité de sécrétion des pectate lyase majeures. De plus, les substrats dépendants du PDZ, comme la pectate lyase PelD, sont sécrétés plus tôt et plus efficacement que les substrats indépendants du PDZ, comme PemA, ou peu dépendants, comme la pectate lyase PelI. Il existe donc un mécanisme d'interaction du domaine PDZ avec les exoprotéines qui peut être à la base de la hiérarchisation de la sécrétion par le T2SS chez *D. dadantii*.

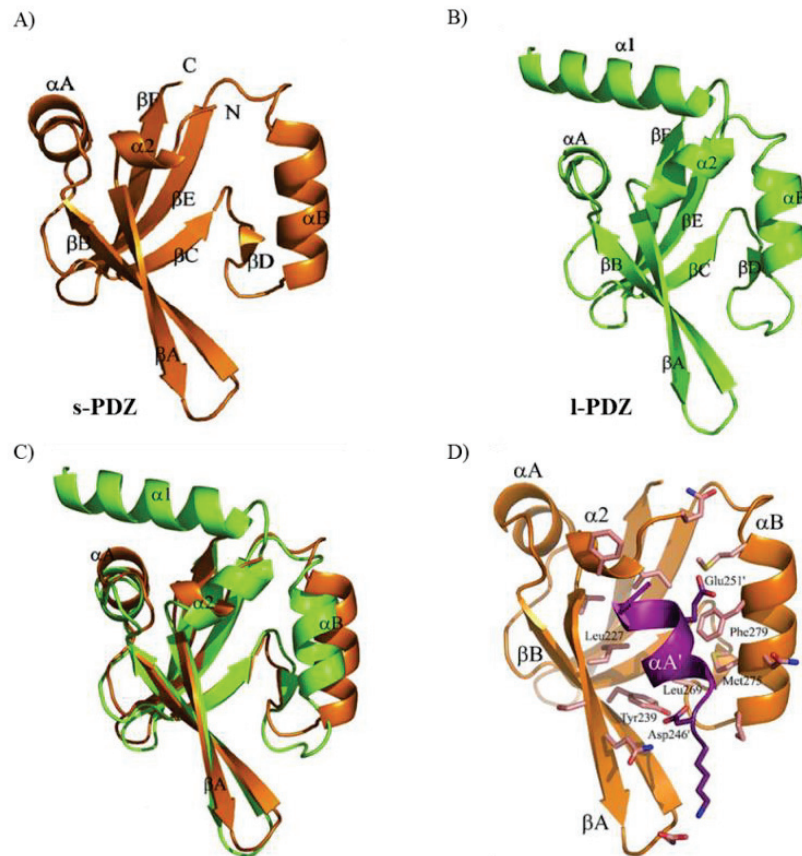


Figure 51. Structure cristallographique du domaine PDZ d'EpsC de *V. cholerae*.

A) Structure de la version courte du domaine PDZ (s-PDZ, 2I6V) contenant les résidus 219-305. B) Structure de la version longue du domaine PDZ (l-PDZ, 2I4S) contenant les résidus 201-305. C) Superposition de deux structures. D) Structure de la version courte du domaine PDZ (s-PDZ) co-cristallisé avec hélices αA d'une autre molécule de s-PDZ (Korotkov *et al.*, 2006).

VIII.4.3.3. Le domaine HR.

Le domaine HR (homology region) est la partie la plus conservée de GspC. La structure du domaine HR a été résolue récemment par cristallographie (EpsC de *V. cholerae* (Korotkov *et al.*, 2011)) et par résonance magnétique nucléaire (OutC de *D. dadantii* (Gu *et al.*, 2012)). Les deux structures sont très similaires : le domaine HR possède 2 feuillets β composés chacun de 3 brins β antiparallèles (Figure 52).

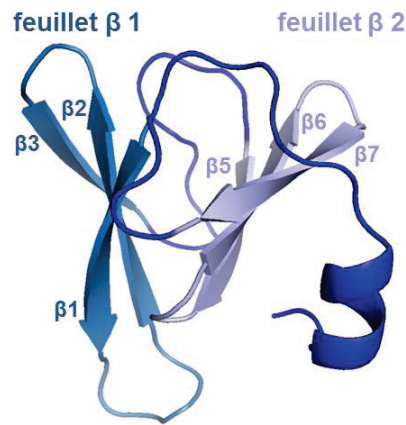


Figure 52. Structure du domaine HR d'OutC de *D. dadantii*. (Gu *et al.*, 2012 ; 2LNV).

Le repliement du domaine HR d'OutC est ressemblé à celui du domaine périplasmique de PilP, un composant de système de pili de type IV T4P (Golovanov *et al.*, 2006) (Figure 53). Les deux domaines ont le même type de topologie organisée en deux feuillets β . Une courte hélice 3_{10} est présente à l'extrémité N-terminale de ces deux structures (Figure 52, Figure 53). Cependant, la structure cristalline de PilP contient un brin β supplémentaire, β_4 , qui est rarement observé dans la structure « in solution » du domaine HR d'OutC à cause d'une grande flexibilité de la structure dans cette région (Gu *et al.*, 2012).

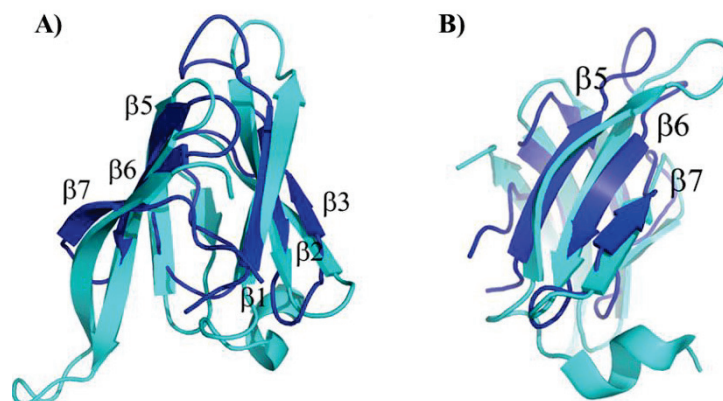


Figure 53. Comparaison des domaines HR d'OutC et PilP.

Le domaine HR de la protéine OutC de *D. dadantii* est représenté en bleu foncé (2LNV) et la partie périplasmique de la protéine PilP de *Neisseria meningitidis* en bleu clair (2IVW).

Il a été démontré que le domaine HR de GspC de *V. cholerae* réagit avec le domaine périplasmique N0 de la sécrétine (Korotkov *et al.*, 2006 ; Korotkov *et al.*, 2011). Une interaction entre HR d'OutC et OutD a été aussi démontrée chez *D. dadantii* par la technique de co-purification (pull-down). Le site d'interaction a été précisé comme une courte région entre les résidus 139-158 (les brins β_6 et β_7) du domaine HR (Login *et al.*, 2010). Cette partie appelée OutC_{sip} (secretin interaction peptide) interagit avec deux sites dans OutD. L'un est situé dans le domaine N0 de GspD et l'autre dans le domaine N2. Les données obtenues par résonance

magnétique nucléaire ont permis de proposer l'interface d'interaction entre le domaine HR d'OutC et le domaine N0 d'OutD de *D. dadantii* (Gu *et al.*, 2012).

Actuellement, trois types d'interactions entre GspC et GspD ont été mises en évidence (Figure 54) :

1. l'interaction entre OutC_{tip} (β6 et β7 du domaine HR) et deux sites d'OutD (β2 et β10) dans les domaines N0 et N2, respectivement (Login *et al.*, 2010)
1. l'interface cristalline qui comprend le brin β1 du domaine HR de GspC et β1 du domaine N0 de GspD (Figure 53 A, 3OSS) (Korotkov *et al.*, 2011)
2. l'interaction entre le brin β1 du domaine HR d'OutC et β3 du domaine N0 d'OutD a été démontrée dans les expériences de résonance magnétique nucléaire (Figure 53 B) (Gu *et al.*, 2012)

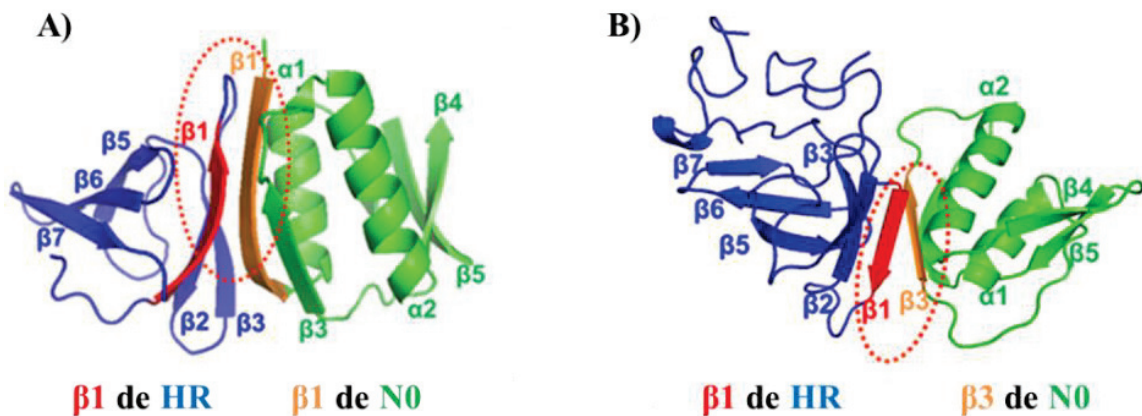


Figure 54. Deux types d'interaction entre le domaine HR de GspC et le domaine N0 de GspD. A) Interface cristalline entre le brin β1 du domaine HR de GspC et β1 du domaine N0 de GspD d'*E. coli* (Korotkov *et al.*, 2011) B) Interface démontrée par résonance magnétique nucléaire entre le brin β1 du domaine HR d'OutC et β3 du domaine N0 d'OutD (Gu *et al.*, 2012). Le domaine HR est représenté en bleu avec le brin β1 en rouge, le domaine N0 d'OutD en vert avec les brins β1 (A) ou β3 (B) en orange. L'interface entre les deux domaines est soulignée avec un cercle rouge pointillé.

Chez *P. aeruginosa* les interactions directes entre les régions périplasmiques de GspC et GspD ont été détectées par résonance des plasmons de surface et co-purification (pull-down). Cette étude a démontré l'interaction entre la région périplasmique de GspC et le sous-domaine N3 de GspD. Cependant, l'interaction entre GspC et le domaine N0 de GspD, mise en évidence chez *D. dadantii* et *E. coli*, n'a pas été observée (Douzi *et al.*, 2011). Cette différence dans l'interface GspC/GspD peut être la cause des différentes techniques utilisées (la résonance des plasmons de surface chez *P. aeruginosa*, co-cristallisation chez *E. coli*, la résonance magnétique nucléaire et co-purification chez *D. dadantii*). Par ailleurs, le T2SS de *P. aeruginosa* est assez

différent du T2SSs de *D. dadantii* et *E. coli*, et les interfaces entre GspC/GspD peuvent refléter des mécanismes différents au sein de ces T2SSs.

Plus récemment, ces interactions ont été testées *in vivo* par la technique de pontage disulfure (Wang *et al.*, 2012). Ce travail auquel j'ai participé est présenté dans la partie résultats (Annexe II, p.248-271).

VIII.4.4. Le pseudopilus.

VIII.4.4.1 Les pseudopilines et la prépiline peptidase.

Les pseudopilines GspG, GspH, GspI, GspJ et GspK (nommées d'après leur homologie avec les pilines du pilus de type IV, T4P) sont impliquées dans la formation d'un pseudopilus qui, dans le cas du T2SS, est court et ne dépasserait pas le périplasme. Une forte similarité entre pilines du T2SS et pseudopilines du T4P a suggéré les origines communes de ces systèmes.

Chaque pseudopiline est composée : A) d'une longue hélice $\alpha 1$ N-terminale (sa première partie est hydrophobe et ressemble à un peptide signal classique) ; B) d'une partie globulaire composée de l'extrémité de l'hélice- $\alpha 1$ et d'un feuillet β de trois ou quatre brins- β ; et C) d'une boucle $\alpha\beta$ qui relie l'hélice $\alpha 1$ au premier brin β du feuillet.

Les pseudopilines sont synthétisées sous une forme de précurseurs (Pugsley & Dupuy, 1992). Les monomères de pseudopilus sont dirigés par le SRP vers le système Sec (Figure 55 A), pourtant la séquence signal n'est pas clivée (Francetic *et al.*, 2007 ; Arts *et al.*, 2007). Les pseudopilines possèdent à leur l'extrémité N-terminale une séquence signal de six ou sept résidus similaire à celle des pilines de T4P. Elle est chargée positivement et assure l'insertion des pseudopilines dans la membrane interne (Figure 55 B). La prépiline peptidase GspO clive cette séquence signal juste après le résidu conservé Gly et ajoute un groupement méthyle à l'extrémité N-terminale. (Figure 55 C). Après le clivage de la séquence signal, les pseudopilines restent insérées dans la membrane interne grâce à la séquence hydrophobe et peuvent être assemblées dans un pilus (Francetic *et al.*, 2007; Arts *et al.*, 2007). La séquence signal des prépilines permet donc l'interaction avec SRP, l'exportation à travers la membrane interne par le système Sec (Figure 55 A), l'ancrage dans la membrane interne (Figure 55 B) et enfin, l'assemblage des pseudopilines en pilus (Figure 55 D).

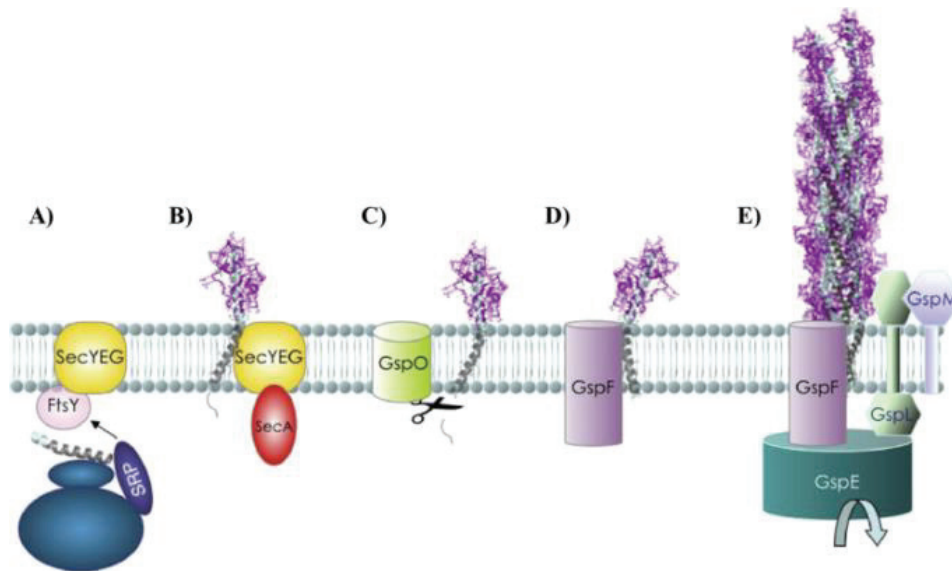


Figure 55. La biogenèse du pseudopilus.

L'hélice $\alpha 1$ N-terminale est représentée en gris. L'hydrophobicité de cette région permet l'interaction avec SRP (A), l'exportation par le système Sec et l'insertion dans la membrane interne (B). La séquence signal est clivée par la prépiline peptidase GspO. Les pseudopilines interagissent au moins avec un composant du T2SS (D) pour permettre l'assemblage dans un pilus (E) (Campos *et al.*, 2013).

La prépiline peptidase est codée par le gène *gspO*, qui est souvent situé à la fin du cluster *gsp*. Pourtant, chez *P. aeruginosa* et *A. hydrophila*, ce gène est situé à côté des gènes de T4P (Pepe *et al.*, 1996 ; Nunn & Lory, 1991). En effet, dans certains cas, une seule prépiline peptidase est utilisée par T2SS et T4P. PilD de *P. aeruginosa* et TapD d'*A. hydrophila* sont indispensables pour la biogenèse des pili T4P et pour la sécrétion par le T2SS. Au contraire, chez *V. cholerae*, il existe deux prépilines peptidases : TcpJ nécessaire à la formation des pili T4P et VcpD qui est importante pour la sécrétion (Marsh & Taylor, 1998). Par ailleurs, les peptidases de la même famille existent chez les archées, par exemple FlaK de *Methanococcus voltae* où elle est importante pour assurer l'assemblage des préflagellines (Bardy & Jarrell, 2003).

La protéine OutO (GspO de *D. dadantii*) possède 8 segments transmembranaires. La première boucle cytoplasmique contient un motif à quatre cystéines qui est impliqué dans la fixation de Zn^{2+} et est nécessaire à l'activité de type méthyle transférase de GspO et PilD, la prépiline peptidase du T4P. Le rôle de la méthylation de la phénylalanine à la position +1 de pilines et pseudopilines n'est pas clair. FlaK, l'homologue de GspO, dans le système flagellaire des archées ne possède pas ce domaine de méthyle transférase. Les résidus aspartate situés dans les deuxième et troisième boucles cytoplasmiques sont importants pour l'activité protéasique de la prépiline peptidase, ce qui a permis de classer ces enzymes dans la famille de peptidases à acide aspartique (LaPointe & Taylor, 2000). FlaK, un homologue de GspO chez les archées, possède dans son site actif un motif conservé GXDG (Hu *et al.*, 2011).

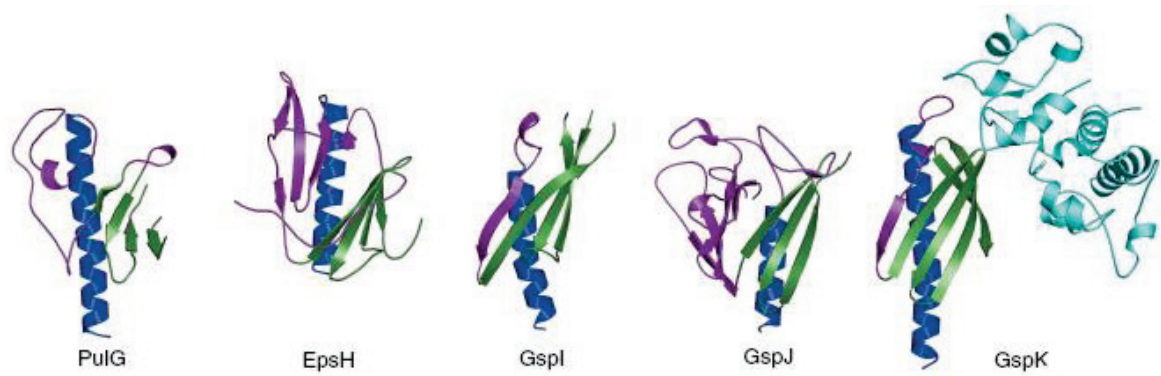


Figure 57. Structures cristallines des pseudopilines.

L'hélice- α à l'extrémité N-terminale est représentée en bleu, le feuillet β conservé est en vert, la région variable est en violet. GspI, GspJ et GspK d'*E.coli* ETEC (3CI0), PulG (GspG, 1T92) de *K. oxytoca* et EpsH (GspH, 2QV8) de *V. cholerae* (Korotkov & Hol, 2008).

Les structures des domaines solubles des pseudopilines majeures PulG de *K. oxytoca* et XcpT de *P. aeruginosa* ont été résolues (Köhler *et al.*, 2004; Alphonse *et al.*, 2010). Elles sont proches de celles de pilines de T4P et possèdent le même type de repliement : une hélice α à l'extrémité N-terminale, un feuillet β de quatre brins antiparallèles et une région variable appelé la boucle $\alpha\beta$ contenant le pont disulfure (Figure 58).

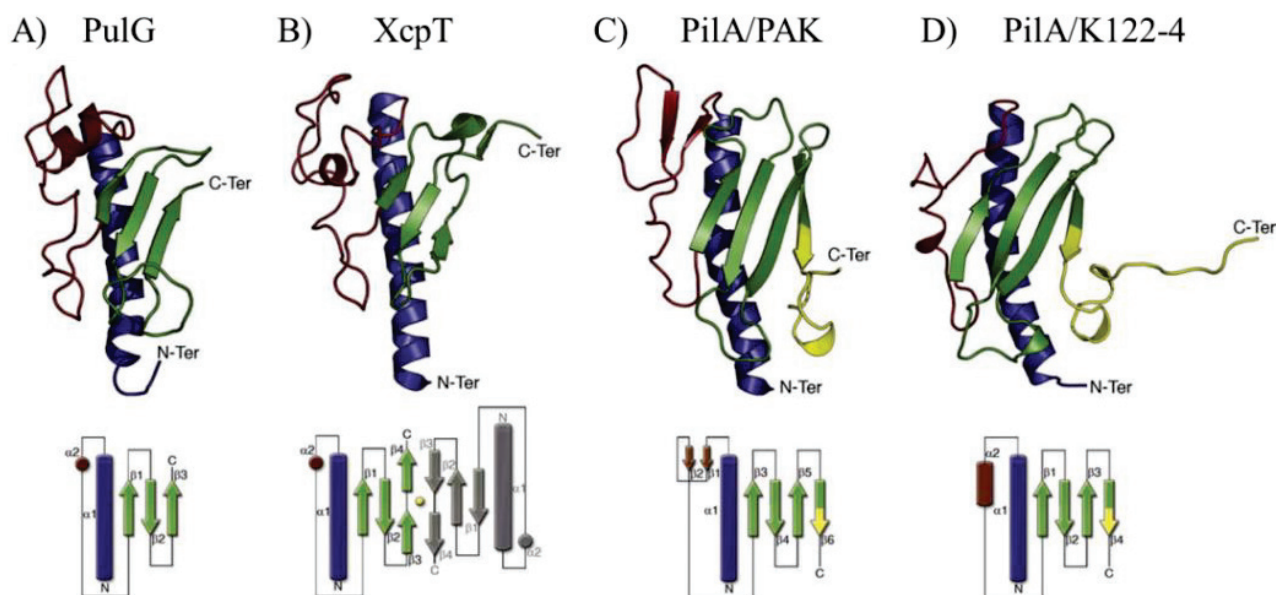


Figure 58. Comparaison des structures de pseudopilines majeures avec les pilines de T4P.

Structures des domaines solubles de pseudopilines :A) PulG de *K. oxytoca* et B) XcpT de *P. aeruginosa*. Structures des domaines solubles des pilines : C) PilA de *P. aeruginosa* PAK D) PilA de *P. aeruginosa* K122-4. L'hélice α N-terminale est représentée en bleu, le feuillet β en vert et la partie variable en rouge. La région présentée en jaune correspond au domaine D des pilines (Alphonse *et al.*, 2010).

Cependant, la pseudopiline majeure du T2SS GspG ne possède ni la boucle $\alpha\beta$, ni le pont disulfure qui sont bien conservés dans les pilines majeures de T4P. Il a été démontré que GspG a

besoin de la présence de l'ion Ca^{+2} pour former une boucle $\alpha\beta$ bien structurée (Korotkov *et al.*, 2009b, Alphonse *et al.*, 2010) (Figure 59).

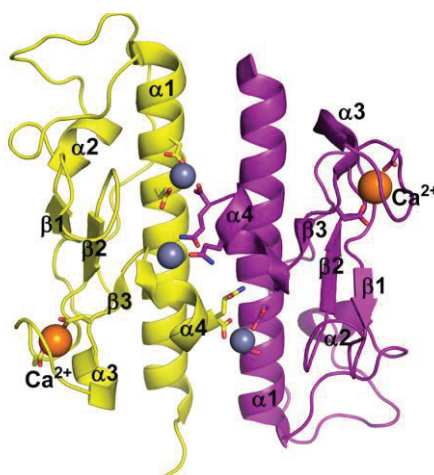


Figure 59. Structure de la pseudopiline GspG de *V. cholerae*.

Les deux sous-unités de GspG sont présentées en jaune et violet. Les ions Ca^{+2} et Zn^{+2} sont représentés en orange et gris (Korotkov *et al.*, 2009b ; 3FU1).

Chez *V. cholerae*, la présence des acides aminés qui forment le site de fixation d'ions calcium est indispensable pour la sécrétion, cependant, la substitution de ces résidus n'affecte pas la stabilité du monomère de GspG d'*E. coli* (Korotkov *et al.*, 2009b). Chez *K. oxytoca*, la substitution de ces résidus diminue fortement la quantité de PulG, ce qui suggère que le calcium joue un rôle dans le processus de repliement et la stabilité de la pseudopiline majeure (Campos *et al.*, 2010). Cette région correspond au domaine variable dans les structures des pilines T4P (Craig *et al.*, 2003).

Les pseudopilines mineures GspH et GspJ possèdent des régions variables plus larges que les autres pseudopilines. Par contre les pseudopilines GspI et GspK ont un simple brin β dans la région variable (Figure 57) (Yanez *et al.*, 2008a ; Yanez *et al.*, 2008b ; Franz *et al.*, 2011 ; Korotkov *et al.*, 2008). Il est possible que cette différence soit en relation avec les rôles de ces protéines dans l'assemblage. La pseudopiline GspK possède un domaine α composé de deux sous-unités identiques et contient un pont disulfure (Pugsley *et al.*, 2001). De plus, elle possède le site de fixation pour deux ions calcium, dont le rôle est inconnu (Korotkov *et al.*, 2008). Cette protéine a une taille d'environ 30 kDa ce qui est supérieur aux autres pseudopilines (Korotkov & Hol, 2008) (Figure 57).

VIII.4.4.2. Multimérisation de PulG et assemblage du pilus.

La pseudopiline majeure GspG s'assemble pour créer une structure filamenteuse (Sauvonnet *et al.*, 2000). La similarité de GspG avec la piline majeure de T4P a laissé supposer

que, comme dans ce système, les protomères de GspG s'assemblaient par interaction de leurs segments transmembranaires pour former un pilus (Craig *et al.*, 2006). En effet, la formation des structures multifibrillaires, appelées hyper-pseudopili, a été visualisée dans les conditions de surexpression des gènes *pul* de *K. oxytoca* (Sauvonnet *et al.*, 2000 ; Vignon *et al.*, 2003) et le système Xcp chez *P. aeruginosa* (Durand *et al.*, 2003).

Seuls des monomères de la pseudopiline majeure GspG peuvent former de longs polymères de hyper-pseudopili. Les pseudopilines mineures n'en sont pas capables même dans les conditions de surexpression (Durand *et al.*, 2005). La formation des hyper-pseudopili est considérée comme un artefact lié aux conditions de surexpression. Leur exposition sur la surface a facilité leur analyse par des techniques biochimiques, de fluorescence ou par la microscopie électronique. Les hyper-pseudopili du T2SS observés par microscopie électronique ont des caractéristiques proches des pili de T4P. Ce sont des structures fines d'un diamètre de 6 nm et flexibles qui sont formées de monomères de PulG arrangés grâce aux contacts des hélices- α (Durand *et al.*, 2003 ; Sauvonnet *et al.*, 2000a).

Les données structurales de PulG et ses homologues ont permis de proposer un modèle d'assemblage du pseudopilus. La structure de la région soluble de PulG (Kohler *et al.*, 2004), du domaine transmembranaire de la piline majeure du T4P PilA (Craig *et al.*, 2006) et la région C-terminale de GspG, contenant un site de fixation au calcium (Korotkov *et al.*, 2009) ont été utilisées pour tester plusieurs possibilités d'assemblage des protomères de PulG (Campos *et al.*, 2010).

Les interactions entre protomères dans ce modèle ont été vérifiées par des expériences de cystéine scanning ou inversion de charges. Ces données sont cohérentes avec le modèle proposé de pseudopilus du T2SS qui est très semblable au modèle du pilus de type IV. Chaque tour d'hélice contient 4,25 sous-unités et le diamètre extérieur est de 65 Å. L'analyse des distances entre les monomères a permis mettre en évidence certains contacts conservés (Campos *et al.*, 2010) (Figure 60 A).

Chaque monomère de PulG (P) interagit avec les monomères P+1, P+3, P+4 et probablement P+7 par des interactions électrostatiques et hydrophobes (Figure 60 B). L'insertion d'un nouveau protomère PulG augmente la longueur du pseudopilus de 10,4 Å (Campos *et al.*, 2010).

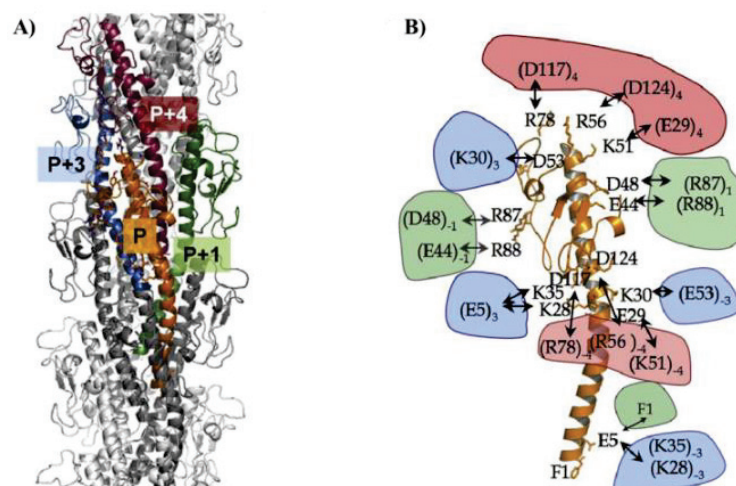


Figure 60. Structure du pilus formé par des monomères de PulG.

A) Assemblage des monomères de PulG dans le pilus. B) Résidus impliqués dans les interactions entre les monomères. Les monomères sont représentés par une couleur différente : le monomère central P (en orange), les monomères suivants P+1 (en vert), P+3 (en bleu), P+4 (en rouge). Les résidus correspondant à chaque monomère sont indiqués par les mêmes couleurs (Campos *et al.*, 2010).

VIII.4.4.3. Interactions entre les pseudopilines.

La présence des pseudopilines mineures est indispensable pour la sécrétion des protéines dans les conditions physiologiques. Pourtant, les hyper-pseudopili peuvent être assemblés en leur absence dans les conditions de surexpression. Ces données ont conduit à l'hypothèse que les pseudopilines mineures sont impliquées dans les interactions avec le substrat. Par contre, les études de complémentation ont démontré que les pseudopilines mineures ne sont pas des déterminants de spécificité du système T2SS (Possot *et al.*, 2000).

La structure de l'hétérotrimère GspKIJ d'*E. coli* ETEC a été résolue par la cristallographie aux rayons X (Korotkov *et al.*, 2008a). Les sous-unités des pseudopilines forment un arrangement triangulaire avec GspK en haut et GspI et GspJ en bas. Les hélices- α N-terminales des trois pseudopilines interagissent au centre du trimère (Figure 61) (Korotkov *et al.*, 2008a).

GspK est probablement située en haut du pseudopilus, son domaine globulaire est placé au dessus des pseudopilines GspI et GspJ (Korotkov *et al.*, 2008a). La surproduction de PulK (GspK de *K. oxytoca*) ou XcpX (GspK de *P. aeruginosa*) diminue l'efficacité de l'assemblage du hyper-pseudopilus. Par contre, la délétion du gène *xcpX* provoque la formation d'hyper-pseudopili très longs, ce qui suggère que la protéine XcpX joue un rôle dans la régulation de la longueur des pili (Durand *et al.*, 2005; Vignon *et al.*, 2003). Une analyse récente par microscopie à fluorescence a démontré que des mutations dans les gènes *pulI* et *pulJ* provoquent

la formation du même type d'hyperpseudo-pili, longs et fins, que chez le mutant *pulK* (Cisneros *et al.*, 2011).

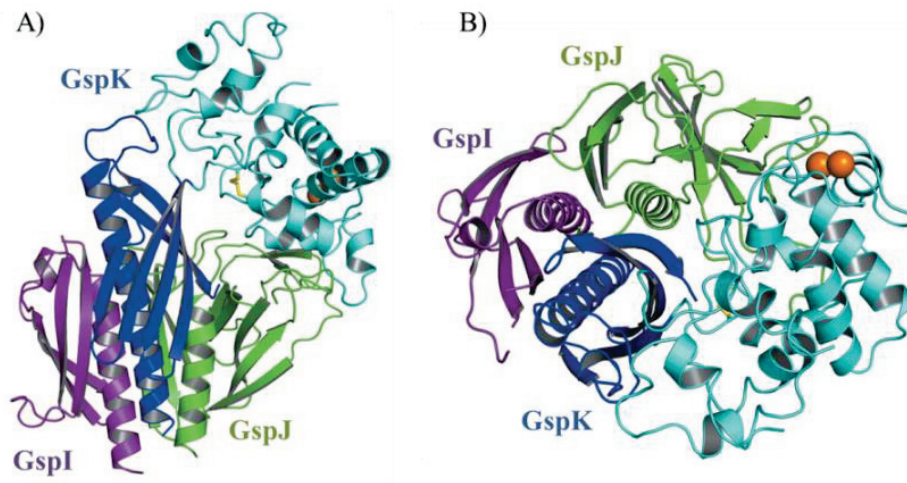


Figure 61. Structure de l'hétérotrimère GspKIJ d'*E. coli* ETEC.

Les pseudopilines sont représentées par des couleurs différentes : GspK (en bleu foncé) avec son domaine soluble (en bleu clair), GspJ (en vert), et GspI (en violet). A) Vue de côté. B) Vue d'en haut (Korotkov *et al.*, 2008a ; 3CI0).

Les études *in vitro* ont démontré que GspH de *P. aeruginosa* interagit avec le trimère de GspIJK (Douzi *et al.*, 2009). Il a été suggéré que GspI joue un rôle dans l'initiation de l'assemblage du pseudopilus (Sauvonnet *et al.*, 2000b). Elle interagit avec GspJ et GspK, ce qui est suivi par le recrutement de GspH (Douzi *et al.*, 2009). Il a été démontré que PulI et PulJ forment un complexe dans la membrane interne et ils interagissent ensuite avec PulK. Ces interactions initialisent l'assemblage du pilus (Cisneros *et al.*, 2011).

La délétion de toutes les pseudopilines mineures affecte complètement la formation de hyperpseudopilus, ce qui démontre leur rôle dans l'initiation de la formation de pilus. Pourtant, l'assemblage du pilus après avoir été initialisé, peut se faire sans la présence de ces protéines et ne dépend que de la quantité de GspG monomérique (Campos *et al.*, 2013).

Certaines données suggèrent que la pseudopiline GspH joue un rôle non pas dans l'initiation, mais plutôt dans une étape de passage de l'initiation à l'élongation du pilus (Cisneros *et al.*, 2012). La présence de GspH est essentielle pour la sécrétion dans les conditions physiologiques, pourtant la sécrétion dans le mutant *pulH* n'est pas réellement affectée dans les conditions de surexpression (Cisneros *et al.*, 2012). Il est absent dans le cluster Stt de *D. dadantii* (Ferrandez & Condemine, 2008).

L'ensemble de ces données a permis de proposer un modèle de biogenèse du pilus (Figure 62). Les protéines GspIJK forment un complexe dans la membrane interne grâce à l'interaction de

leurs hélices- α N-terminales (Figure 62 A). Ce complexe interagit avec la protéine GspH (Figure 62 B). La formation du tétramère GspHIJK et l'interaction avec les composants de la membrane interne stimulent le recrutement de la pseudopiline majeure GspG (Figure 62 C) et sa polymérisation grâce au fonctionnement et l'action de l'ATPase GspE (Figure 62 D).

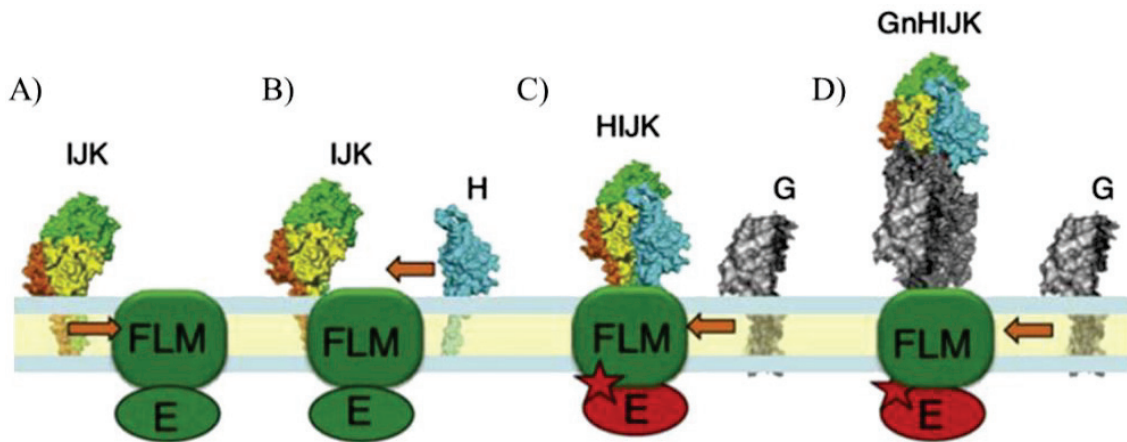


Figure 62. Modèle de l'assemblage de pilus.

A) Les pseudopiline mineures GspIJK forment un complexe dans la membrane interne. (B) Elles interagissent avec la pseudopiline GspH. (C) Le tétramère GspIJKH interagit avec les protéines de la membrane interne ce qui transmet le signal à l'ATPase GspE. (D) cette interaction provoque le recrutement de la pseudopiline majeure GspG et sa multimérisation (Campos *et al.*, 2013).

VIII.4.4.4 Mécanisme de fonctionnement du pseudopilus.

La question qui reste à résoudre est de comprendre quel est le mécanisme de fonctionnement du pseudopilus. Il n'y a pas d'évidence que les pseudopilus puissent se rétracter, donc, nous n'avons pas d'information concernant l'élaboration de cycles d'assemblage/désassemblage. Certains systèmes de T4P assurent aussi la sécrétion de protéines, par exemple, le système TCP (toxine co-régulée avec pilus) chez *V. cholerae*, qui secrète le facteur de colonisation TcpF (Kirn *et al.*, 2003). Ce système ne possède pas d'ATPase de rétraction ce qui suggère que la rétraction de pilus n'est pas indispensable pour la sécrétion. L'absence de l'ATPase de T2SS pourrait provoquer la dégradation de hyper-pseudopilus (Durand *et al.*, 2005). Il a été proposé que ce soit la protéine GspK qui provoque la dégradation des filaments formés par GspG (Durand *et al.*, 2005). De plus, les pseudopiline peuvent être plus sensibles aux dégradations que les pili de T4P, car leur boucle à l'extrémité C-terminale est moins stable. Egalement, le changement de la concentration de Ca^{+2} peut jouer un rôle majeur dans l'intégrité des sous-unités (Korotkov *et al.*, 2009b). Actuellement, il existe deux modèles de fonctionnement du pseudopilus : le modèle de type « piston » et le modèle « vis d'Archimède » (Nunn, 1999).

Le modèle de type « piston » semble être le plus probable (Figure 63). Il suppose que le substrat de sécrétion (A) interagisse avec les pseudopilines mineures GspHIJK (Figure 63 A). L'élongation du pilus grâce à la polymérisation de GspG (Figure 63 B) pousse le substrat à travers le pore formé par la sécrétine dans la membrane externe (Figure 63 C) jusqu'à sa libération dans le milieu extracellulaire (Figure 63 D).

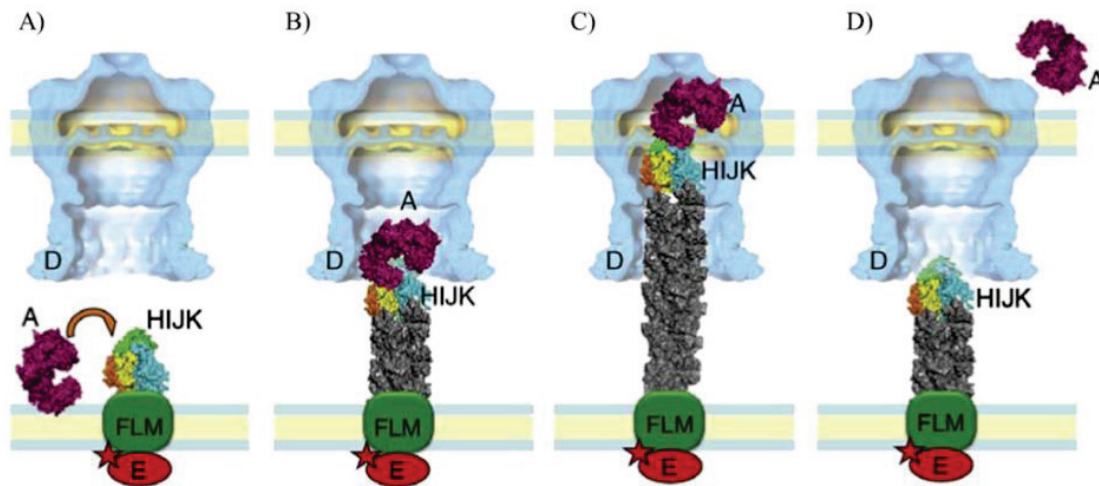


Figure 63. Modèle du fonctionnement du pseudopilus par le principe du piston.

Ce modèle est cohérent avec les données obtenues par la résonance des plasmons de surface chez *P. aeruginosa* (Douzi *et al.*, 2011). Notamment, il a été démontré que les pseudopilines mineures XcpU (GspH), XcpV (GspI), XcpW (GspJ) et XcpX (GspK) interagissent avec le substrat spécifique du système, la protéine LasB, et n'interagissent pas avec le substrat d'un autre T2SS de *P. aeruginosa*, Hxc.

Le problème de ce modèle de fonctionnement est qu'il n'existe aucune évidence de la rétraction du pilus de T2SS, ce qui est nécessaire pour réinitialiser le système et charger un autre substrat à sécréter. Dans le T4P, la fonction de désassemblage du pilus est assurée par l'ATPase de rétraction. Il a été proposé que le pseudopilus de T2SS puisse être dégradé ou désassemblé après la fin de cycle de sécrétion et que la pseudopiline GspK puisse catalyser cette dégradation (Durand *et al.*, 2005).

Il existe un autre modèle du fonctionnement de pseudopilus du T2SS par le principe de la vis d'Archimède (Nunn, 1999) (Figure 64).

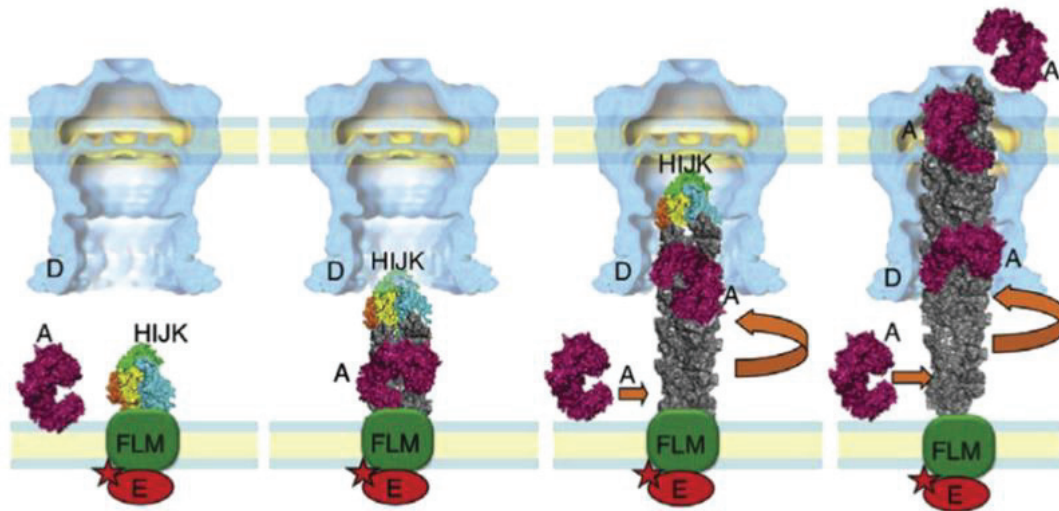


Figure 64. Modèle du fonctionnement du pseudopilus par le principe de la vis d'Archimède.

Ce modèle propose la reconnaissance du substrat à sécréter par la base du pseudopilus, ce qui suggère que des monomères de la pseudopiline majeure GspG pourraient former la surface d'interaction (Figure 64 ; Campos *et al.*, 2013). La polymérisation du pilus est couplée avec sa rotation ce qui permet la propulsion du substrat à travers le pore de la sécrétine. Par contre, peu de données expérimentales soutiennent ce type de fonctionnement. Effectivement, l'interaction entre le substrat PulA avec le pilus formé par PulG a été mise en évidence chez *K. oxytoca* (Vignon *et al.*, 2003). D'un côté, les données génétiques montrent que la pseudopiline majeure GspG peut être échangée entre les espèces *D. dadantii*, *V. cholerae* et *K. oxytoca* (Campos *et al.*, 2013). D'un autre côté, cet échange n'est pas possible chez les espèces plus éloignées. Pour le moment, le modèle le plus probable semble donc être le modèle du piston.

Les données génétiques ont démontré l'interaction entre la pseudopiline majeure GspG et l'ATPase GspE (Kagame *et al.*, 1998). Les études biochimiques et de pontage ont permis de mettre en évidence l'interaction de la protéine de la membrane GspL avec la pseudopiline majeure GspG (Gray *et al.*, 2011) et la pseudopiline mineure GspJ (Douet *et al.*, 2004). La protéine GspE est ancrée dans la membrane interne grâce à l'interaction avec la protéine GspL. Il a été proposé que la protéine GspL joue le rôle principal dans la transmission de l'énergie pour l'assemblage du pilus. Une autre protéine importante pour la sécrétion et la formation de pseudopilus est GspF (Durand *et al.*, 2005).

VIII.4.5. L'ATPase GspE : le fournisseur d'énergie de T2SS.

VIII.4.5.1. Description générale.

Comme on l'a déjà évoqué, les systèmes T2SS et T4P partagent certaines similarités au niveau de leur architecture et du fonctionnement suggérant une origine commune. Cependant, ces systèmes possèdent quelques différences notables. Premièrement, les pili de type IV sont composés d'environ mille sous-unités de piline, qui forment des structures bien exposées au milieu extracellulaire. Par contre, le pseudopilus de T2SS serait composé de cinq à vingt monomères de pseudopiline majeure GspG (Köhler *et al.*, 2004) et, dans les conditions physiologiques, il ne dépasse pas du périplasma. Deuxièmement, la majorité des machineries de T4P possèdent deux ou même trois ATPases : une ATPase d'assemblage et une ou deux ATPases de désassemblage du pilus (Craig & Li, 2008 ; Giltner *et al.*, 2012). Les machineries de T2SS ne possèdent plus souvent qu'une seule ATPase : GspE. Une deuxième ATPase GspA n'est présente que dans certains T2SS.

GspE est une protéine de la famille des ATPases AAA (Peabody *et al.*, 2003). Presque toutes les ATPases de T2SS possèdent trois régions : deux domaines N-terminaux (N1D et N2D) et le domaine C-terminal (CTD) (Figure 65). Chez certaines espèces, l'ATPase possède un domaine supplémentaire, N0 (Chen *et al.*, 2005). Le domaine C-terminal CTD est composé de trois sous-domaines : le domaine de liaison au nucléotide (C1D), le domaine hélicoïdal (C2D) et le domaine de fixation aux métaux (CMD) (Figure 65). Le domaine CMD possède un motif à quatre cystéines nécessaire à la fixation d'un ion de zinc (Camberg *et al.*, 2007 ; Robien *et al.*, 2003). L'ATPase d'assemblage de T4P a le même type d'organisation, par contre, l'ATPase de rétraction de T4P ne possède pas de domaine N1D ni CMD (Figure 65).

Le domaine C1D de GspE possède deux motifs de Walker, A et B et les boîtes His et Asp, qui sont essentielles à la sécrétion (Possot *et al.*, 1994; Camberg *et al.*, 2005; Sandkvist *et al.*, 1995 ; Turner *et al.*, 1993; Py *et al.*, 1999). Le motif Walker A possède une boucle riche en prolines et le site de fixation au nucléotide. Les mutations dans le motif Walker A de GspE de *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *D. dadantii* ou *K. oxytoca* arrêtent complètement la sécrétion, ce qui suggère que ce motif joue un rôle essentiel pour la fixation de l'ATP et pour le fonctionnement du système (Possot *et al.*, 1994 ; Turner *et al.*, 1993 ; Py *et al.*, 1999 ; Sandkvist *et al.*, 1995). Par contre, les mutations dans le motif Walker B n'affectent pas de la sécrétion (Possot *et al.*, 1994).

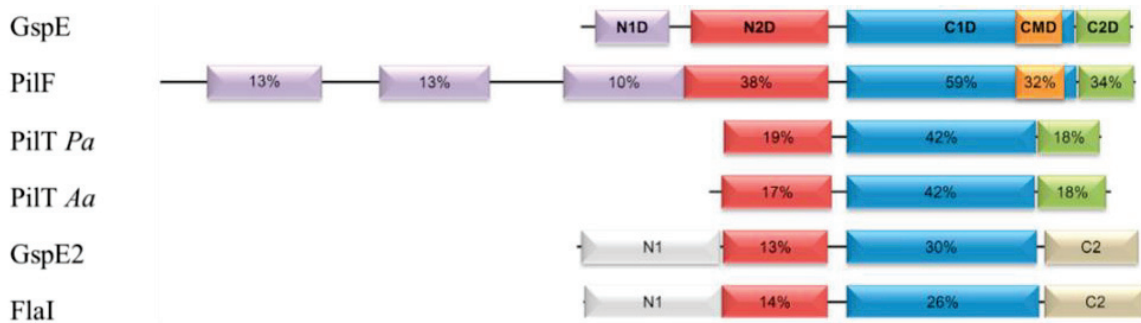


Figure 65. Représentation schématique de la structure des ATPases de la famille AAA.

L'ATPase GspE de T2SS de *V. cholerae* ; l'ATPase de l'assemblage de T4P de *Thermus thermophilus* ; PilTPa, l'ATPase de rétraction de T4P de *P. aeruginosa* ; PilTAa, l'ATPase de rétraction de T4P de *Aquifex aeolicus* ; GspE2, une de trois ATPases de l'archée *Archaeoglobus fulgidus* et FlaI, l'ATPase de *Sulfolobus acidocaldarius*. Les domaines homologues sont représentés par la même couleur et avec le pourcentage d'identité de séquence (Lu *et al.*, 2013).

L'ATPase du T2SS possède trois motifs supplémentaires spécifiques à ce type d'ATPases : 1) une «boîte Asp» située entre les deux motifs Walker A et Walker B, et composé de deux régions riches en acide aspartique. Cette région peut être impliquée dans la fixation de Mg^{2+} et jouer un rôle de stabilisation du site de fixation au NTP. 2) une «boîte His » composée de deux résidus de histidine et située à coté du motif Walker B avec un rôle inconnu. 3) un motif composé de 4 cystéines impliquées dans la fixation de Zn^{2+} . Le même motif de fixation de Zn^{2+} est présent dans la protéine PilB, l'ATPase d'assemblage du système T4P (Camberg *et al.*, 2005).

La structure cristalline d'EpsE (GspE de *V. cholerae*) sans le domaine N1 a été résolue sous la forme d'un complexe avec l'ATP (Figure 66) (Robien *et al.*, 2003 ; 1P9W). Dans la structure, le domaine N2 forme une large interface d'interaction avec les domaines C1 et C_M (Figure 66 A).

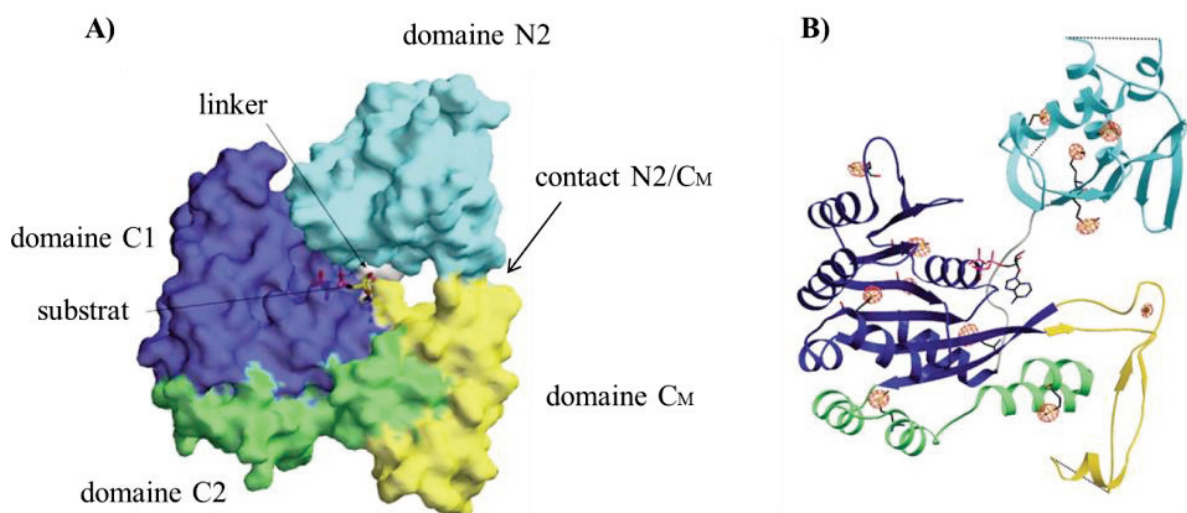


Figure 66. Structure d'EpsE de *V. cholerae*.

A) Représentation spatiale. B) Structures secondaires correspondant à chaque domaine. Les domaines sont représentés par une couleur différente : N2 en bleu clair, C1 en bleu foncé, C2 en vert et C_M en jaune. Le linker situé entre les domaines N2 et C1 est représenté en blanc (Robien *et al.*, 2003).

Des expériences de co-purification (pull down) ont démontré que les deux domaines, N-terminal et C-terminal, de XpsE interagissent en présence d'un analogue de l'ATP (Shiue *et al.*, 2007). Le sous-domaine N2 du domaine N-terminal de XpsE bloque l'activité l'ATPasique du domaine C-terminal. La mutation de résidu R286, situé dans le domaine C-terminal affecte l'interaction entre ces deux domaines, ce qui aboutit à une activité l'ATPasique constante et élevée. De plus, il a été démontré que la protéine GspE change sa conformation en présence de GspL (Py *et al.*, 1999 ; Shiue *et al.*, 2007) (Figure 67). Il a été proposé que ce changement conformationnel puisse se produire seulement lorsque le motif Walker A est intact.

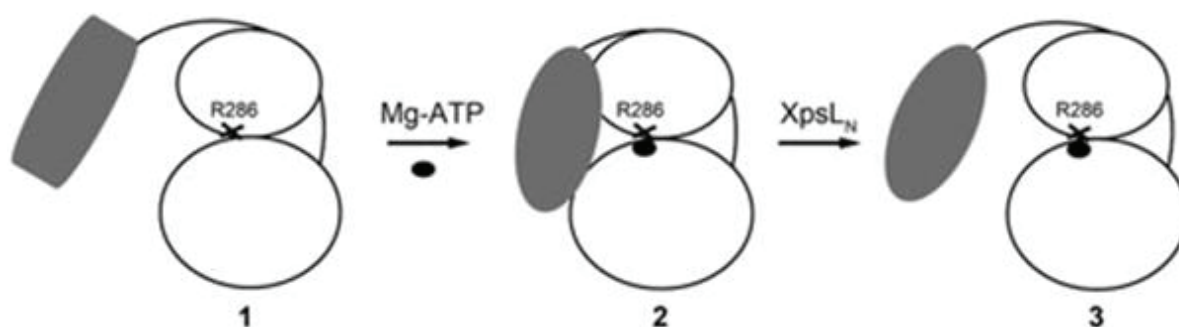


Figure 67. Changement conformationnel de XpsE provoqué par la fixation de l'ATP ou de XpsL.

Le domaine N est représenté par deux formes différentes qui correspondent à deux conformations, avant et après la fixation de l'ATP : 1) par un rectangle, pour l'état sans ATP et 2) par un ovale, pour l'état avec l'ATP. Le domaine C est représenté par deux cercles qui correspondent aux deux sous domaines. Les deux domaines C et N sont connectés par un linker flexible (Shiue *et al.*, 2007).

VIII.4.5.2. Multimérisation de GspE.

Il a été démontré que la protéine tronquée GspE sans le domaine N1D est capable de former des filaments d'une symétrie de 6₁ (Robien *et al.*, 2003), ce qui peut indiquer la nature oligomérique de cette protéine. La formation des hexamères en présence des nucléotides a été aussi suggérée pour la protéine XpsE (GspE de *X. campestris*) (Shiue *et al.*, 2007). La formation des hexamères a été mise en évidence pour l'ATPase de rétraction PilT de T4P et l'ATPase de flagelle chez les archées (Misic *et al.*, 2005 ; Yamagata & Tainer, 2007 ; Satyshur *et al.*, 2007 ; Patrick *et al.*, 2011). L'ATPase PilT du T4P de *P. aeruginosa* a été aussi caractérisée sous la forme d'un hexamère (Misic *et al.*, 2010 ; Satyshur *et al.*, 2007).

Très récemment, la structure d'EpsE fusionnée à Hcp1 (**H**eme **c**arrier **p**rotein 1) a été résolue par la cristallographie aux rayons X (Lu *et al.*, 2013). L'activité enzymatique de la forme

hexamérique d'EpsE est vingt fois supérieure à celui du monomère. Cette étude a permis de caractériser deux structures différentes ayant chacune une symétrie proche de C_6 (Figure 68 A) et C_2 (Figure 68 B).

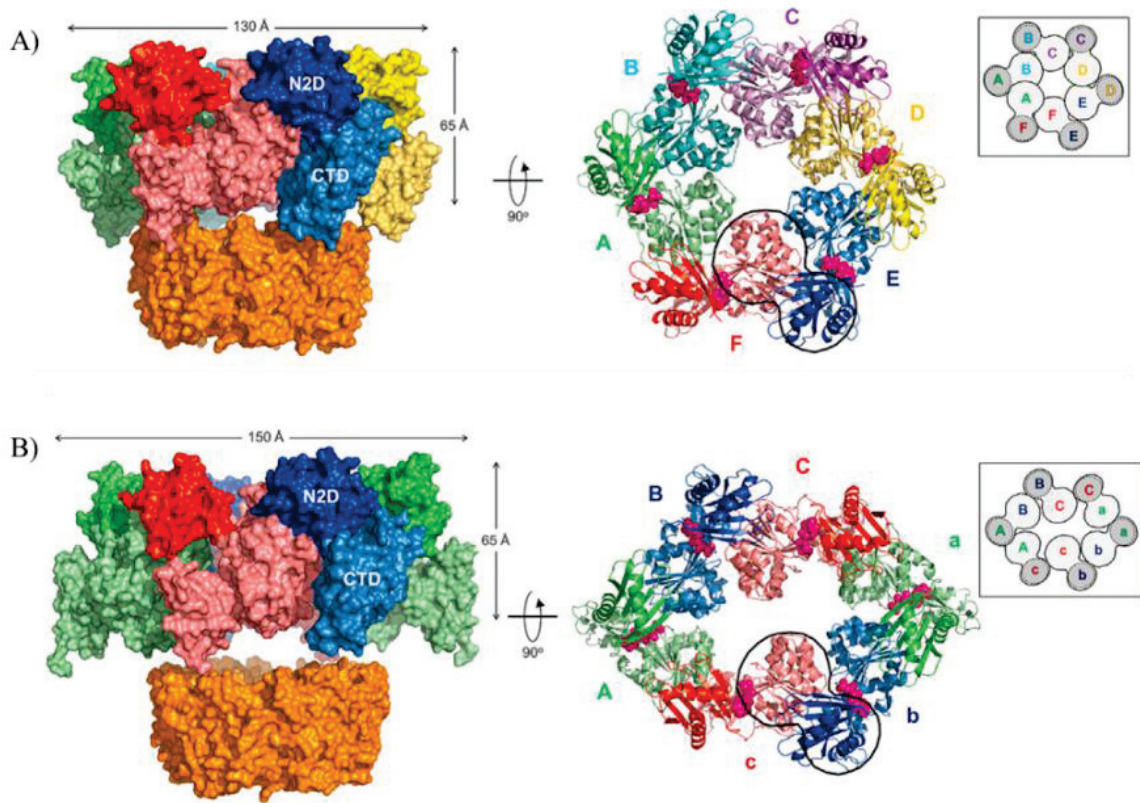


Figure 68. Structures cristallines des hexamères GspE^{AN1}-Hcp1.

A) Structure de GspE^{AN1}-6aa-Hcp1 avec un type de symétrie quasi C_6 . B) Structure de GspE^{AN1}-86aa-Hcp1 avec un type de symétrie C_2 . Chaque monomère est représenté par une couleur différente (Lu *et al.*, 2013).

L'oligomérisation de GspE et son activité ATPasique sont fortement augmentées en présence du domaine cytoplasmique de GspL et des phospholipides acides (Camberg *et al.*, 2007). Cependant, l'oligomérisation de GspE et son interaction avec GspL sont dépendantes de la fixation, mais pas de l'hydrolyse de l'ATP (Shiue *et al.*, 2006). Il a été suggéré que les changements conformationnels de GspE provoqués par l'hydrolyse d'ATP favorisent des changements de conformation du pilus (Figure 69).

Bien que certaines ATPases hexamériques de la famille AAA, soient connues pour fournir l'énergie nécessaire à la rotation (dans le cas du flagelle chez les archées), dans le cas du T2SS cette énergie peut être utilisée pour des réarrangements structuraux dans ce complexe.

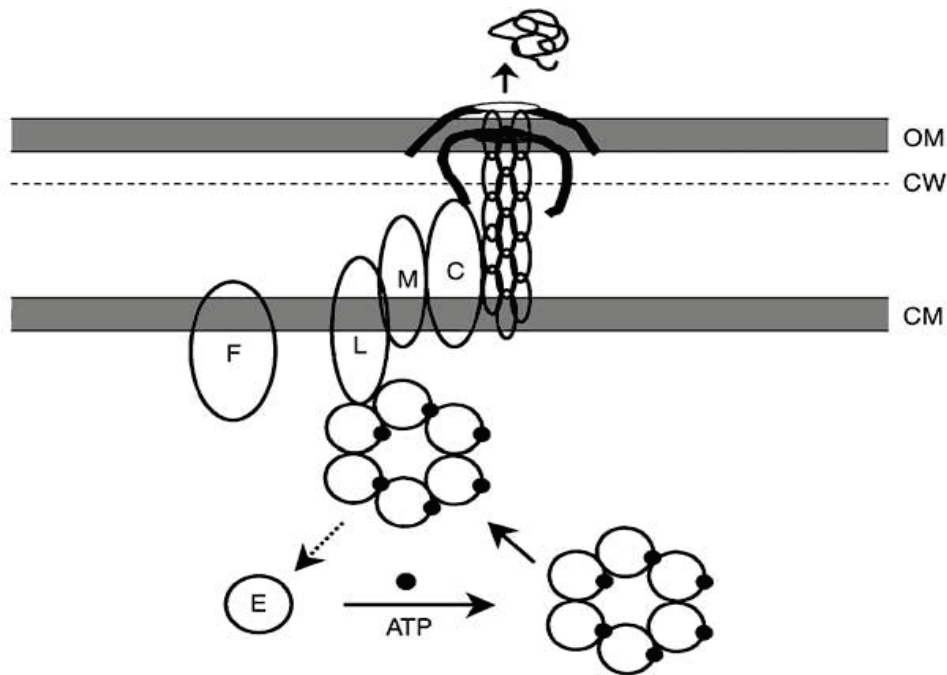


Figure 69. Modèle de sécrétion par T2SS impliquant l'ATPase.

Les cercles noirs représentent les molécules de l'ATP (Shiue *et al.*, 2006).

VIII.4.6. La protéine GspF.

GspF est une protéine polytopique de la membrane interne. Elle possède une petite boucle périplasmique et deux grands domaines cytoplasmiques connectés aux trois segments transmembranaires. L'extrémité N-terminale est localisée dans le cytoplasme et l'extrémité C-terminale est exposée dans le périplasma (Thomas *et al.*, 1997; Arts *et al.*, 2007) (Figure 70).

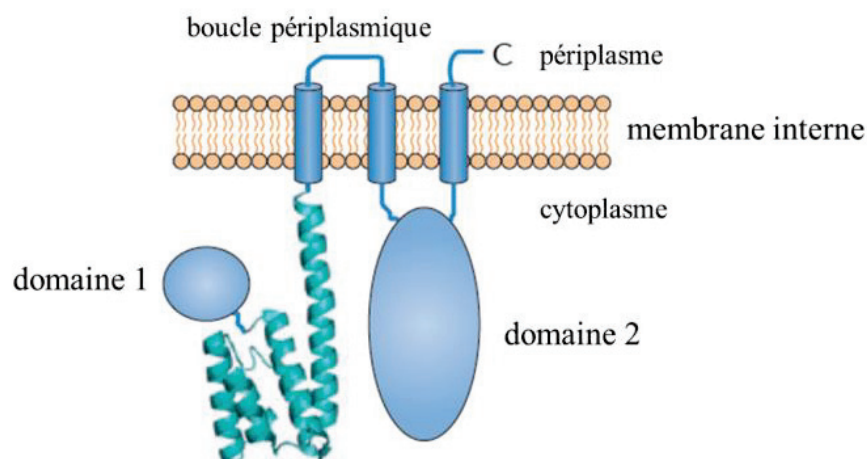


Figure 70. Organisation de GspF.

La structure d'un des trois domaines cytoplasmiques d'EpsF a été résolue chez *V. cholerae* (3C1Q). Les domaines 1 et 2 sont représentés par les cercles (d'après Korotkov *et al.*, 2012).

Des expériences de double hybride levure ont démontré que le domaine cytoplasmique N-terminal de GspF interagit avec l'ATPase GspE et avec le domaine cytoplasmique de GspL. La présence de GspL est nécessaire pour la formation du complexe GspE-GspF, par contre, la formation du complexe GspE-GspL est indépendante de GspF (Py *et al.*, 2001). Ces données suggèrent que la protéine GspE interagit d'abord avec GspL, et par la suite, ce complexe va interagir avec GspF. La protéine XcpS (GspF de *P. aeruginosa*) est instable en absence des autres composants de T2SS, pourtant elle devient plus stable en présence de XcpR (GspE) et XcpY (GspL). La boucle cytoplasmique localisée à l'extrémité C-terminale de XcpS (GspF) a été proposé comme un site d'interaction avec XcpR (GspE) et XcpY (GspL). La présence de cet élément est indispensable pour la stabilité du complexe de la membrane interne (Arts *et al.*, 2007). La construction des protéines hybrides entre GspF de *P. aeruginosa* et *P. putida* ont confirmé que l'interaction avec les composants du T2SS s'effectue via les domaines cytoplasmiques de GspF (Arts *et al.*, 2007).

La structure du domaine cytoplasmique N-terminal d'EpsF de *V. cholerae* (cyto-EpsF) a été résolue (Abendroth *et al.*, 2009). Ce domaine est composé de six hélices- α organisées en deux feuillets (Figure 71). Deux molécules de cyto-EpsF forment un dimère contenant deux sites de fixation de calcium. Les études de pontage chimique *in vivo* ont confirmé la formation de dimère par EpsF (Abendroth *et al.*, 2009).

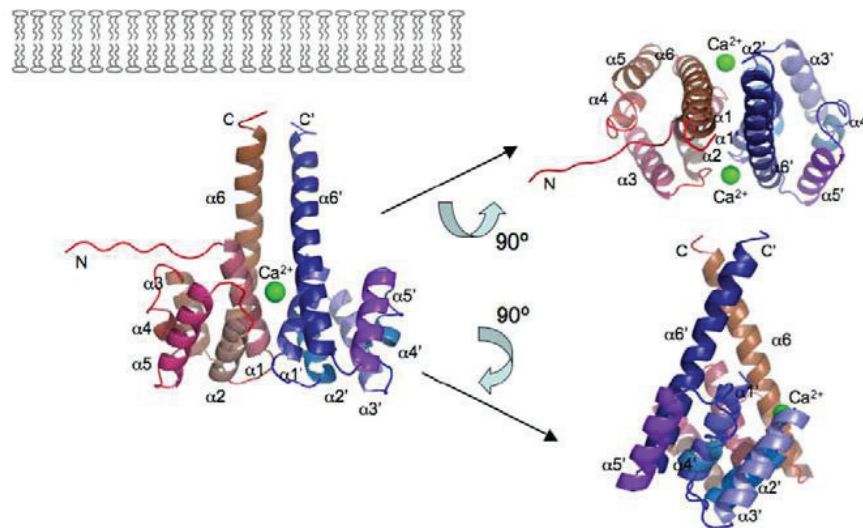


Figure 71. Dimère formé par deux domaines cytoplasmiques d'EpsF (cyto-EpsF) de *V. cholerae*.

Chaque domaine est composé de 6 hélices α en deux feuillets, les ions calcium situés à l'interface sont représentés en vert (Abendroth *et al.*, 2009).

VIII.4.7. La protéine GspL.

VIII.4.7.1. Description générale

La protéine GspL est une protéine bitopique de la membrane interne. Elle est composée de trois domaines : le domaine cytoplasmique, un segment transmembranaire et le domaine périplasmique (Bleves *et al.*, 1996) (Figure 72).

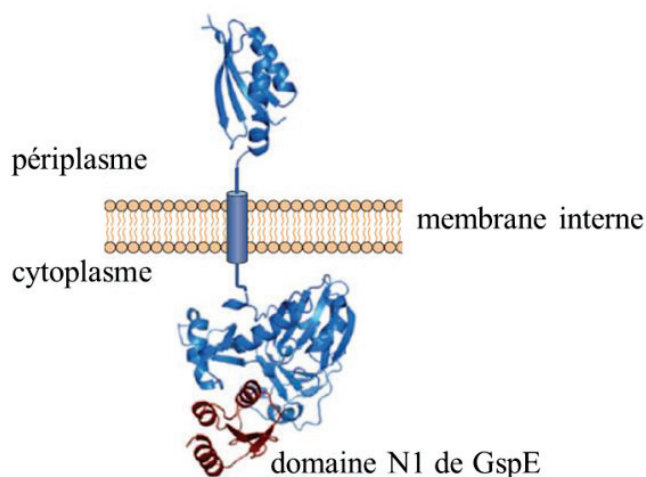


Figure 72. Représentation de GspL.

Structure du domaine périplasmique d'EpsL (GspL de *Vibrio parahaemolyticus*, 2W7V), du complexe du domaine cytoplasmique d'EpsL et le domaine N1 de l'EpsE (en rouge) de *V. cholerae* (2BH1) (d'après Korotkov *et al.*, 2012).

Les structures des domaines cytoplasmique et périplasmique d'EpsL de *V. cholerae* ont été résolues (Abendroth *et al.*, 2004 ; Abendroth *et al.*, 2009). La partie cytoplasmique est composée de sous-domaines I, II, et III. Il a été démontré que les sous-domaines II et III interagissent avec la partie N-terminale de GspE (Abendroth *et al.*, 2005) (Figure 73).

La structure du domaine cytoplasmique de GspL possède une similarité avec celle de l'ATPase de type actine (Abendroth *et al.*, 2004). Cependant, GspL ne possède pas de site de fixation de l'ATP. Par contre, l'homologue de GspL dans le système T4P, la protéine PilM, possède un site actif de fixation de l'ATP (Karuppiah & Derrick, 2011).

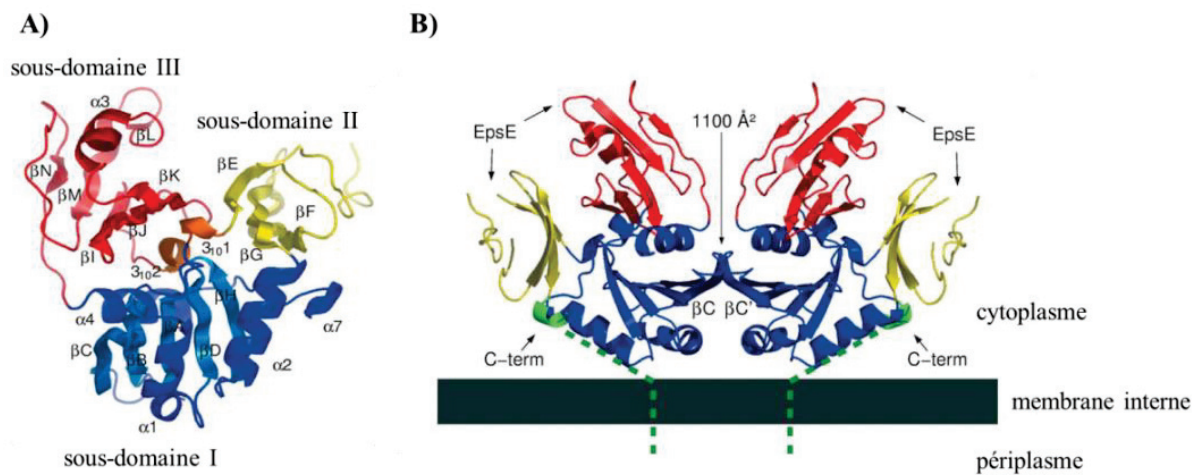


Figure 73. Structure cristallographique du domaine cytoplasmique d'EpsL (GspL de *V. cholerae*).

A) Le domaine cytoplasmique d'EpsL est composé de trois sous-domaines I (en bleu), II (en jaune) et III (en rouge). B) Structure du dimère formé par les domaines cytoplasmiques. L'interface se fait grâce à l'interaction des brins βC . Les lignes pointillées vertes représentent la continuation de l'hélice α qui est insérée dans la membrane interne (Abendroth *et al.*, 2004).

Les sous-domaines I et III d'EpsL présentent une grande similarité structurale avec les domaines 2A et 1A des protéines de liaison à l'ATP de type actine comme ParM. Par contre, ce domaine de GspL n'est pas capable de former des filaments, parce qu'il ne possède pas de domaines nécessaires à la polymérisation.

Le sous-domaine II d'EpsL présente une similarité de structure avec le domaine 1C de la protéine FtsA (Abendroth *et al.*, 2004). FtsA est impliquée dans le recrutement des autres protéines pendant le processus de division cellulaire (Rico *et al.*, 2004). L'homologie de séquence et la structure du domaine 1C de FtsA et du sous-domaine II d'EpsL suggèrent que ce dernier, lui aussi, pourrait être impliqué dans les interactions protéine-protéine.

VIII.4.7.2. Le domaine cytoplasmique de GspL.

La formation d'un dimère par GspL a été premièrement suggérée par les expériences de filtration sur gel (GspL de *V. cholerae*) (Sandkvist *et al.*, 1999). Les études réalisées par le double-hybride levure ont mis en évidence la dimérisation de la région cytoplasmique d'OutL (GspL de *D. dadantii*) (Py *et al.*, 1999). Plus tard, la structure du dimère formé par les domaines cytoplasmiques d'EpsL a été résolue (Abendroth *et al.*, 2004) (Figure 74 B). L'interface du dimère est formée par l'interaction des brins βC des sous-domaines I (Figure 74 B).

Ensuite, la structure du domaine cytoplasmique d'EpsL a été résolue en complexe avec la partie cytoplasmique d'EpsE (Abendroth *et al.*, 2005) (Figure 74). Dans cette structure, la majorité de l'interface EpsL/E est constituée du sous-domaine II d'EpsL (Figure 74 A et B).

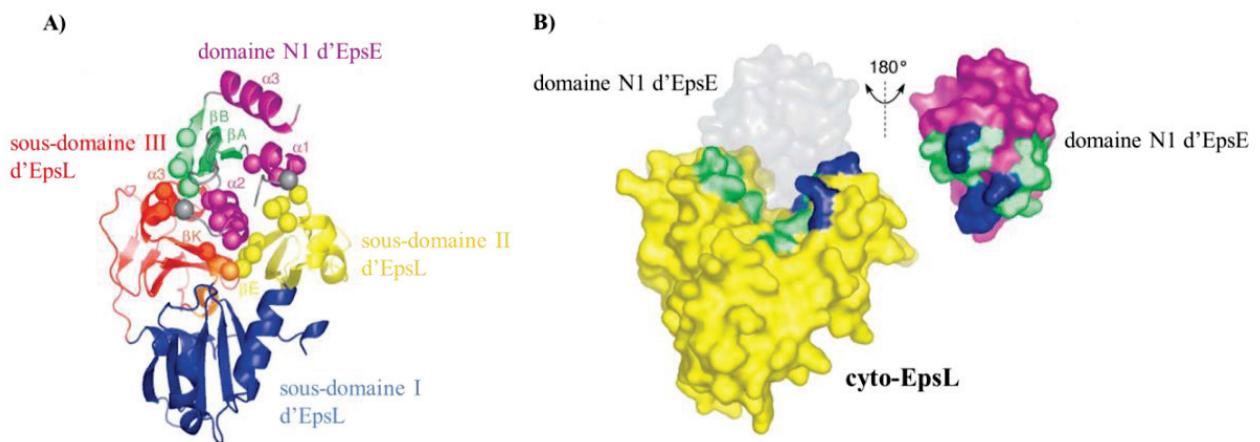


Figure 74. Interactions entre le domaine N1 d'EpsE et la partie cytoplasmique d'EpsL.

A) Structure du complexe. Le domaine N1 d'EpsE est représenté en violet et vert. Les trois sous-domaines de cyto-EpsL sont représentés par des couleurs différentes : le sous-domaine I en bleu, le sous-domaine II en jaune et le sous-domaine III en rouge. Les résidus impliqués dans l'interaction N1-EpsE sont situés dans l'hélice- $\alpha2$ et $\alpha1$ et le brin βC . Les résidus de cyto-EpsL impliqués dans la formation du complexe appartiennent aux sous-domaines II et III. B) La représentation de l'interface entre N1-EpsE et cyto-EpsL. Le domaine N1 d'EpsE est représenté séparément avec un changement d'orientation à 180°. La partie cytoplasmique d'EpsL est représentée en jaune. Les contacts hydrophobes sont représentés en vert et les contacts polaires en bleu (Abendroth *et al.*, 2005).

VIII.4.7.3. Le domaine périplasmique de GspL

La structure de la région périplasmique de GspL a été résolue par la cristallographie aux rayons X (Abendroth *et al.*, 2009a). Il a été démontré par la technique de double-hybride levure que cette région est capable de se dimériser (Py *et al.*, 1999 ; Py *et al.*, 2001 ; Douet *et al.*, 2004). Plus récemment, cette région a été cristallisée sous la forme d'un dimère (Abendroth *et al.*, 2009a) (Figure 75).

Le domaine périplasmique a un repliement atypique de type ferrédoxine, car il est représenté par deux sous-domaines composés chacun d'une suite de $\alpha\beta\beta$, en comparaison avec $\beta\alpha\beta$ dans le cas de ferrédoxine. Les deux sous-unités de GspL forment un grand feuillet β composé de 8 brins (Figure 75).

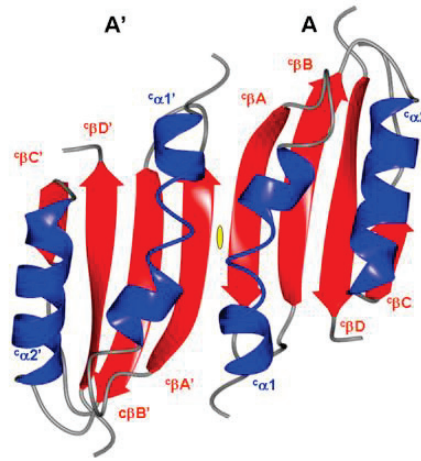


Figure 75. Structure de dimère du domaine périplasmique d'EpsL de *Vibrio parahaemolyticus*.

Le site d'interaction dans le dimère cristallin de EpsLper est présenté par des résidus hydrophobes, dont cinq situés dans le brin βA et trois, dans l'hélice $\alpha 1$. Ces résidus sont fortement conservés chez les différentes protéines GspL (Abendroth *et al.*, 2009a).

VIII.4.8. La protéine GspM

GspM est aussi une protéine bitopique de la membrane interne (Bleves *et al.*, 1996) mais, en différence de GspL, son segment cytoplasmique est très court (Figure 76).

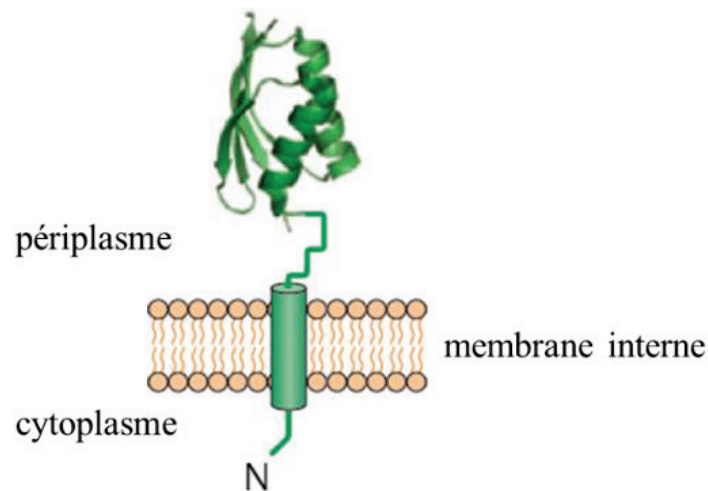


Figure 76. Représentation de GspM.

La structure du domaine périplasmique est représentée par la structure d'EpsM (GspM de *V. cholerae*, 1UV7) (d'après Korotkov *et al.*, 2012).

Des expériences de filtration sur gel ont démontré que la protéine EpsM (GspM de *V. cholerae*) se comporte comme un monomère contrairement au EpsL (Sandkvist *et al.*, 1999). Cependant, l'homodimérisation de la région périplasmique d'OutM (GspL de *D. dadantii*) a été détectée par la technique de double-hybride levure (Py *et al.*, 1999 ; Douet *et al.*, 2004). La structure de la partie C-terminale de cette région d'EpsM a été résolue (Abendroth *et al.*, 2004).

Les formes dimériques ont été retrouvées dans les mailles des cristaux. Chaque monomère est composé de quatre brins β et deux hélices α , structurées comme dans le domaine de type ferrédoxine dans le cas de GspL (Figure 77 A et B). Les structures des dimères formés par les régions périplasmiques d'EpsL et EpsM peuvent être superposées avec un RMSD de 2,1 Å, tandis que ces régions ne possèdent que 18 % d'identité au niveau des séquences (Abendroth *et al.*, 2009).

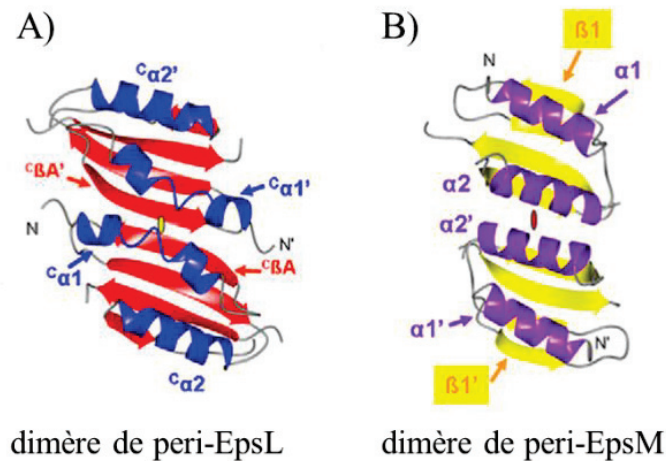


Figure 77. Comparaison de dimères formés par les domaines périplasmiques d'EpsL et EpsM.

Par contre, les sites de contact entre les monomères sont différents dans les cas d'EpsL et EpsM (Figure 77 A et B). L'interface du dimère dans le cas d'EpsM est formée par les hélices $\alpha 2$ (Figure 77B) et celle d'EpsL par les brins βA et l'hélice $\alpha 1$.

Il a été démontré que GspM est nécessaire à la stabilité de GspL, car la quantité de GspL est directement dépendante de celle de GspM (Michel *et al.*, 1998). Dans la structure du dimère d'EpsM, une densité est présente dans l'interface qui connecte les deux monomères, ce qui peut constituer un site d'interaction potentiel avec un partenaire externe.

VIII.4.9. Les interactions entre les protéines de la membrane interne.

Plusieurs études ont démontré des interactions directes entre GspL et GspM (Michel *et al.*, 1998 ; Sandkvist *et al.*, 1999 , Lee *et al.*, 2004, Py *et al.*, 2001). Les mêmes conclusions ont été tirées des études réalisées sur les homologues de ces protéines dans le T4P (Sampaleanu *et al.*, 2009).

Les études réalisées chez *P. aeruginosa* ont démontré que trois zones distinctes de la région périplasmique de GspM sont importantes pour l'interaction avec GspL (Robert *et al.*, 2002). Il a aussi été démontré que la présence de GspC peut influencer les interactions entre GspL et GspM

(Robert *et al.*, 2002). Par exemple, chez *X. campestris*, GspL se dissocie plus vite du complexe GspL/GspM que du complexe GspC/GspL/GspM (Tsai *et al.*, 2002). De plus, la co-immunoprécipitation de GspL, GspC et GspE avec les anticorps dirigés contre GspM a confirmé l'existence du complexe entre ces quatre protéines (GspM/L/C/E) de la membrane interne (Possot *et al.*, 2000).

Les données obtenues dans les études avec des protéines purifiées montrent la similarité des domaines périplasmiques de type de ferrédoxine (Abendroth *et al.*, 2009). Les expériences de double hybride chez la levure ont démontré que les interactions GspM-GspM et GspL-L sont moins fortes que les interactions GspL-GspM (Py *et al.*, 2001). De même, dans le système T4P, l'hétérodimérisation des protéines homologues, PilN (GspL_{pér}) et PilO (GspM) est préférable à leur homodimérisation (Sampaleanu *et al.*, 2009).

Un modèle d'organisation des composants de T2SS de la membrane interne a été proposé à la base des données structurales de GspE ; GspL et GspM et des interactions entre leurs domaines mises en évidence (Abendroth *et al.*, 2009) (Figure 78).

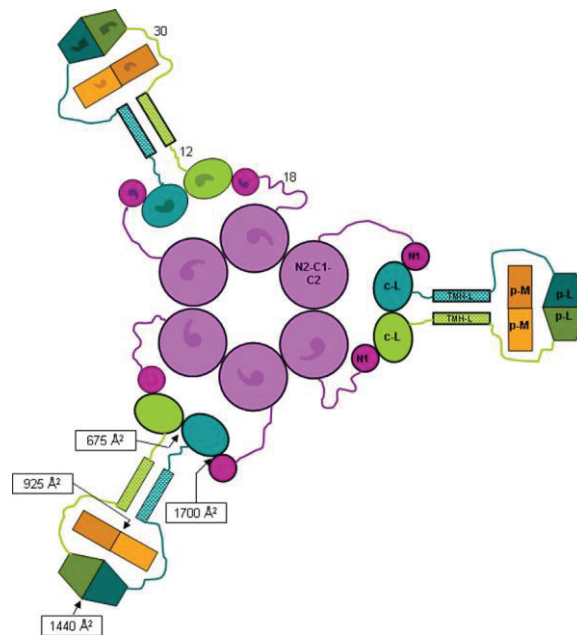


Figure 78. Modèle de l'organisation des composants GspE, GspL et GspM.

La protéine GspL est représentée en vert, GspE en violet et GspM en jaune. Vue de haut du côté du périplasma (Abendroth *et al.*, 2009).

De plus, une interaction entre GspL et la pseudopiline mineure GspJ a été démontrée par la technique de double-hybride levure (Douet *et al.*, 2004). La technique de pontage chimique *in vivo* a permis de démontrer une interaction directe entre GspL et la pseudopiline majeure GspG

(Gray *et al.*, 2011). Ces données suggèrent que GspL joue un rôle de connecteur entre l'ATPase et les pseudopilines et peut transmettre l'énergie nécessaire à la sécrétion des substrats.

VIII.5. Les protéines sécrétées par le T2SS.

Ces dernières années, beaucoup de données structurales et fonctionnelles ont été collectées sur l'assemblage et l'architecture du T2SS. Cependant, le mode d'organisation et de fonctionnement de cette machine n'est pas toujours clair. Notamment, la question principale qui reste à résoudre concerne le mécanisme de recrutement des protéines à sécréter par la machinerie du T2SS : comment ces protéines sont-elles reconnues et quels sont les composants du système impliqués dans cette reconnaissance ?

Le processus de sécrétion par le T2SS se fait en deux étapes : premièrement les protéines traversent la membrane interne soit par la voie Sec soit par la voie Tat (Voulhoux *et al.*, 2001). La séquence signal est clivée et les substrats du T2SS se trouvent dans le périplasma (Hirst & Holmgren, 1987). Les protéines exportées dans le périplasma par le translocon Tat sont déjà dans un état replié, tandis que les substrats du T2SS qui passent par le translocon Sec doivent se replier avant d'être prises en charge par la machinerie de type II. L'étape périplasmique de la sécrétion serait d'une durée très courte. Cela a été démontré grâce à l'utilisation de la protéine hybride constituée de l'élastase et la colicine A (Voulhoux *et al.*, 2001). Dans ces expériences, la protéine hybride a été sécrétée si vite que la colicine n'avait pas le temps de s'insérer dans la membrane et causer un effet toxique.

Lors de cette étape périplasmique, les substrats du T2SS se trouvent dans le périplasma parmi de nombreuses protéines périplasmiques ainsi que des protéines dirigées vers la membrane externe. Il doit donc exister un mécanisme très fin pour assurer la reconnaissance des substrats par le T2SS et les distinguer des protéines résidentielles du périplasma. Actuellement, il existe un certain nombre d'informations concernant le mécanisme possible d'une telle reconnaissance.

VIII.5.1. Spécificité de sécrétion par le T2SS.

Le T2SS est largement répandu et ces composants sont relativement bien conservés chez les bactéries à Gram négatif, il assure la sécrétion d'un large spectre de substrats, parmi lesquels des toxines et des enzymes lytiques. Une des premières questions est : « Le T2SS, est-il capable de sécréter les protéines hétérologues ? ». Des travaux réalisés ont démontré que le T2SS possède une spécificité remarquable. Par exemple, les deux cellulases, Cel5 (EGZ) de *D. dadantii* et CelV de *P. carotovorum*, possèdent 40 % d'identité mais elles ne peuvent être sécrétées que par leur propre T2SSs (Chapon *et al.*, 2000). De même pour les pectate lyases PelI de *D. dadantii* et Pel3 de *P. carotovorum* qui partagent 67 % d'identité (Bouley *et al.*, 2001). Cependant, il a été

démontré que la sécrétion hétérologue est possible entre des espèces proches. Par exemple, la lipase de *Burkholderia glumae* est sécrétée par le T2SS de *P. aeruginosa* (Frenken *et al.*, 1993a; Frenken *et al.*, 1993b) et l'aérolysine d'*A. hydrophila* est sécrétée par le T2SS de *Vibrio* (Wong *et al.*, 1990). De même, la lipase de *P. alcaligenes* est sécrétée par le T2SS de *P. aeruginosa* (Gerritse *et al.*, 1990) et l'élastase de *P. aeruginosa* est sécrétée par le T2SS de *P. alcaligenes* (de Groot *et al.*, 2001).

Par ailleurs, le spectre des substrats sécrétés par un T2SS donné peut être très large. Les substrats des T2SSs sont en général des enzymes hydrolytiques : des protéases ; des lipases, des phosphatases et des toxines. La quantité des substrats sécrétés par un T2SS varie entre une seule protéine (par exemple, la pullulanase de *K. oxytoca*) ; ou 15 protéines chez *P. aeruginosa*, *P. carotovorum* ou encore jusqu'à 20 protéines et plus chez *V. cholerae* (Sikora *et al.*, 2011) et *L. pneumophila*. Par exemple, le T2SS de *P. aeruginosa* assure la sécrétion d'une lipase, une élastase, une phosphatase alcaline, une phospholipase et l'exotoxine A (Martinez *et al.*, 1999). Chez *V. cholerae* le T2SS était connu pour sécréter une lipase, une chitinase, la toxine cholérique, une hémagglutinine protéase et GbpA. Récemment, 16 nouveaux substrats ont été identifiés, y compris une sialidase, deux aminopeptidases, le cytolysine, trois protéases à serine etc (Sikora *et al.*, 2011). Chez *D. dadantii*, plusieurs enzymes dégradant la paroi végétale sont sécrétées par le T2SS appelé Out :

- une pectine méthylestérase PemA (Laurent *et al.*, 1993)
- une pectine acétylestérase PaeY (Shevchik & Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997)
- une polygalacturonase PehN (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2002)
- une rhamnogalacturonate lyase RhiE (Laatu & Condemine, 2003)
- une cellulase Cel5 (ou CelZ) (Zhou *et al.*, 1999),
- neuf endo-pectate lyases ayant des propriétés enzymatiques et le repliements différents, PelA, PelB, PelC, PelD, PelE, PelI, PelL, PelN et PelZ (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2014),
- une estérase FaeD et une protéine de type Avr, AvrL (Kazemi-Pour *et al.*, 2004)

Souvent, les diverses protéines sécrétées par le même T2SS ne présentent que peu ou pas de similarités notables dans leurs séquences et structures. Cependant, ces protéines doivent comporter au moins un motif de sécrétion commun leur permettant d'être reconnues par ce T2SS. Plusieurs études ont été menées pour identifier ce motif. L'hypothèse actuelle stipule que les protéines ne peuvent être reconnues et sécrétées par le T2SS que sous une forme repliée.

Une hypothèse : les substrats sont pris en charge par le T2SS sous une forme repliée.

Premièrement, des alignements des séquences de différentes protéines secrétées par le même T2SS n'ont pas permis de retrouver une séquence-consensus commune. Ceci peut indiquer que des résidus situés loin l'un de l'autre dans la séquence linéaire peuvent faire partie du même motif de sécrétion dans la forme repliée de la protéine à sécréter. Les études effectuées chez de nombreuses bactéries ont permis de conforter cette hypothèse.

Première preuve : la formation des ponts disulfure avant la sécrétion.

Les études réalisées avec la cellulase et les pectate lyases de *D. dadantii* ainsi que la pullulanase de *K. oxytoca* ont démontré que la formation de ponts disulfure est une condition préalable à la sécrétion (Pugsley *et al.*, 1993 ; Bortoli-German *et al.*, 1994). Les ponts disulfure se forment dans le périplasme avec l'aide d'un système spécialisé incluant les disulfure isomérases périplasmiques DsbA et DsbC (Shevchik *et al.*, 1995 ; Urban *et al.*, 2011 ; Braun *et al.*, 2001). La formation des ponts disulfure dans les pectate lyases de *D. dadantii* est indispensable à leur repliement, d'où l'importance de ce système pour la sécrétion. Il a été aussi proposé que la formation des ponts disulfure soit directement liée à la reconnaissance du substrat par le T2SS. Cependant, cette hypothèse a été écartée, car plusieurs substrats, y compris la cellulase CelV secrétée par le T2SS de *P. carotovorum* et RhiE de *D. dadantii* ne possèdent aucun pont disulfure (Cooper *et al.*, 1993 ; Laatu & Condemine, 2003). De plus, la pullulanase mutée qui ne possède plus de cystéines est secrétée efficacement (Sauvonnet & Pugsley, 1998). La présence de DsbA est importante pour la sécrétion de lipase par le T2SS de *P. aeruginosa* (Liebeton *et al.*, 2001). La formation des ponts disulfure a été étudiée plus en détail chez *P. aeruginosa* (Braun *et al.*, 2001) (Figure 79).

L'élastase est synthétisée sous la forme d'une pré-protéine avec la séquence signal Sec clivable (étape 1). Les ponts disulfures ne peuvent pas se former dans le cytoplasme et la protéine passe par la voie Sec sous une forme non repliée (étape 2). La formation des ponts disulfure est catalysée par DsbA. Il a été démontré que les deux ponts disulfure de l'élastase sont formés successivement. Un pont disulfure à l'extrémité C-terminale de la protéine est formé quand le substrat est encore sous une forme de la pré-élastase (étape 3). La formation de ce pont disulfure est indispensable à l'activité auto-protéolytique (étape 4). La formation du deuxième pont disulfure à l'extrémité N-terminale s'effectue après le clivage de la pré-protéine en pro-peptide et l'élastase (étape 5). Le pro-peptide reste en interaction avec l'élastase de manière non covalente et ce complexe est ensuite pris en charge par le T2SS (étape 6). Ce complexe va se dissocier dans le milieu extracellulaire (étape 7) où le pro-peptide sera dégradé (étape 8).

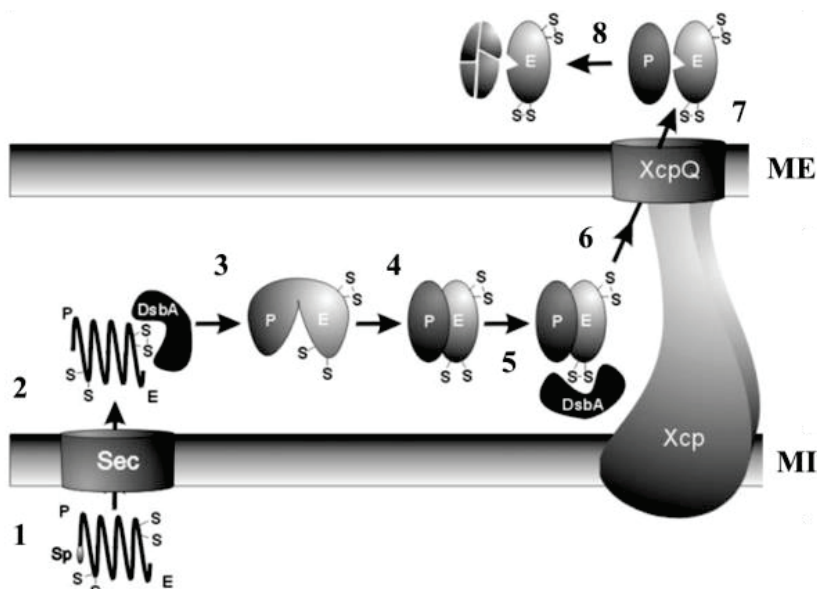


Figure 79. Modèle de sécrétion de l'élastase chez *P. aeruginosa* incluant la formation des ponts disulfure.

L'élastase est représentée par deux sous-unités : P (propeptide) et E (élastase maturée) (Braun *et al.*, 2001).

Cet exemple montre la complexité du processus qui peut avoir lieu lors de l'étape périplasmique de sécrétion par le T2SS. De plus, le repliement de l'élastase semble être dépendant de la présence d'un pro-peptide, qui peut être considéré comme un chaperon (Braun *et al.*, 1996). Le repliement correct et la sécrétion des lipases chez *Pseudomonas* sont dépendants des protéines Lif (Frenken *et al.*, 1993). Les autres études proposent l'implication de la protéine PlcR pour l'activité de la phospholipase C chez *P. aeruginosa* (Cota-Gomez *et al.*, 1997).

Dans le cas de la cellulase Cel5 de *D. dadantii*, la mutation d'au moins une cystéine abolie complètement sa sécrétion (Bortoli-German *et al.*, 1994). Il est possible que la formation de ponts disulfure stabilise la structure du substrat sous une forme compatible avec sa reconnaissance par le système. Ainsi, l'importance de ponts disulfure, dépend de la stabilité de la protéine en leur absence (Filloux *et al.*, 2004). Dans ce cas, le motif devrait être très sensible aux changements dans la structure de la protéine. Cette idée est cohérente avec les données obtenues chez *D. dadantii*, car même des changements minimes dans la structure de la cellulase Cel5 arrêtent la sécrétion de cette protéine (Py *et al.*, 1993). Chez *A. salmonicida*, la substitution d'un seul résidu W227 abolit la sécrétion de l'aérolysine (Wong *et al.*, 1991).

Deuxième preuve : l'assemblage des substrats multimériques s'effectue avant la sécrétion.

Il existe des substrats de T2SS qui sont multimériques, par exemple, la toxine cholérique CT AB₅ de *V. cholerae* et la toxine LT (heat-labile enterotoxin) sécrétée par *E. coli* (Spangler, 1992). Les structures cristallines de ces toxines montrent qu'elles sont composées d'un anneau de cinq sous-unités B de 11,6 kDa chacune et d'une sous-unité A de 28 kDa (Sixma *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 1995). La partie pentamérique B₅ des deux toxines est responsable de la fixation sur le ganglioside des cellules intestinales (Merritt *et al.*, 1994). Les mécanismes de production et d'assemblage des toxines CT et LT ont été étudiés en détails. Premièrement, chaque sous-unité est produite sous la forme d'un précurseur, qui est ensuite exporté par la voie Sec grâce à sa séquence signal N-terminale clivable. Une fois exportées dans le périplasme, les sous-unités vont être assemblées dans le complexe multimérique AB₅ grâce à la formation de ponts disulfure par la disulfure isomérase DsbA (Hirst & Holmgren, 1987b ; Peek *et al.*, 1992 ; Yu *et al.*, 1992). Seul le complexe assemblé sous la forme AB₅ peut être pris en charge et sécrété par la machinerie de type II. Il a été proposé que les sous-unités B portent les informations nécessaires à la sécrétion par le T2SS tandis que la sous-unité A ne semble pas être impliquée dans la reconnaissance.

L'ensemble de ces données ont confirmé l'hypothèse que des substrats de T2SS sont reconnus et sécrétés sous une forme repliée.

VIII.5.2. Quel est le motif de la sécrétion ?

Des données intéressantes ont été obtenues pour la cellulase Cel5. Cette protéine adopte une conformation compatible avec la sécrétion, dans laquelle le domaine de fixation de la cellulose et le domaine catalytique interagissent entre eux (Chapon *et al.*, 2000). Après la sécrétion, la protéine change l'organisation de ses domaines pour pouvoir interagir avec la cellulose. Ces données permettent d'imaginer que la structure du substrat reconnu par le T2SS peut être différente de la structure de la protéine mature et active.

Chez *K. oxytoca*, la présence de deux régions distinctes de PulA, A et B, est nécessaire à la sécrétion des protéines hybrides PulA-BlaM et PulA-CelZ (Sauvonnet *et al.*, 1996). Ces deux régions peuvent former ensemble un seul motif nécessaire à la reconnaissance par le T2SS. Dans une étude plus récente, une troisième région de PulA importante pour la sécrétion a été identifiée (Francetic & Pugsley, 2005). Trois régions séparées ont été aussi identifiées comme indispensables pour la sécrétion de la polygalacturonase PehA chez *P. carotovorum* : la région A (les résidus de 84 à 135), B (190-242) et C (342-369). Il a été proposé que la région B porterait le

motif structural dit principal, tandis que les régions B et C seront nécessaires à sa présentation correcte à la machinerie de sécrétion (Palomaki *et al.*, 2002).

L'exotoxine A est composée de trois domaines : le domaine I (responsable de la fixation sur les cellules hôtes), le domaine II (le domaine de translocation) et le domaine III (catalytique). Le mécanisme de sécrétion de cette protéine a fait objet de multiples études qui sont néanmoins les sujets de certaines controverses. D'une part, la présence des 60 résidus du domaine I (60-120) est suffisante pour assurer la sécrétion de la protéine hybride ExeA (60-120) -BlaM (Voulhoux *et al.*, 2000). D'autre part, une protéine qui contient les 30 premiers résidus et les 305 derniers résidus du domaine III, mais pas les résidus 60-120 a été sécrétée efficacement (Lu & Lory, 1996). De plus, des changements dans le domaine II diminuent fortement l'efficacité de la sécrétion d'ExeA mutée (McVay & Hamood, 1995).

Plusieurs substrats sécrétés par le T2SS sont riches en brins β (Korotkov *et al.*, 2012). Il a été proposé que l'organisation en brins β puisse être liée au mécanisme de reconnaissance. Cette hypothèse est cohérente avec la structure du domaine II de l'exotoxine A qui est très riche en brins β antiparallèles et est indispensable pour la sécrétion (Voulhoux *et al.*, 2000). Cependant, beaucoup de protéines sécrétées par le T2SS, comme la lipase de *P. aeruginosa* ou encore, CelZ de *D. dadantii* ne sont pas très riches en brins β et ne contiennent au total pas plus de brins β que les protéines périplasmiques, comme LolA. Il est donc difficile d'imaginer comment les protéines peuvent être distinguées par la machinerie sur ce critère compte tenu d'une faible différence en nombre de brins β dans leur structure (Takeda *et al.*, 2003).

Les structures tridimensionnelles de plusieurs substrats de T2SS sont actuellement disponibles. C'est le cas chez *V. cholerae* : la toxine cholérique AB5 (O'Neal *et al.*, 2004), la neuraminidase (Moustafa *et al.*, 2004), la chitinase A de *Vibrio charveyi* qui possèdent 82 % d'identité avec celle de *V. cholerae* (Songsiriritthigul *et al.*, 2008) (Figure 80 A), chez *K. oxytoca* (Figure 80 B). Chez *Burkholderia glumae* la structure d'un complexe entre la lipase sécrétée par le T2SS et son chaperon a été résolue (Pauwels *et al.*, 2006) (Figure 80 C).

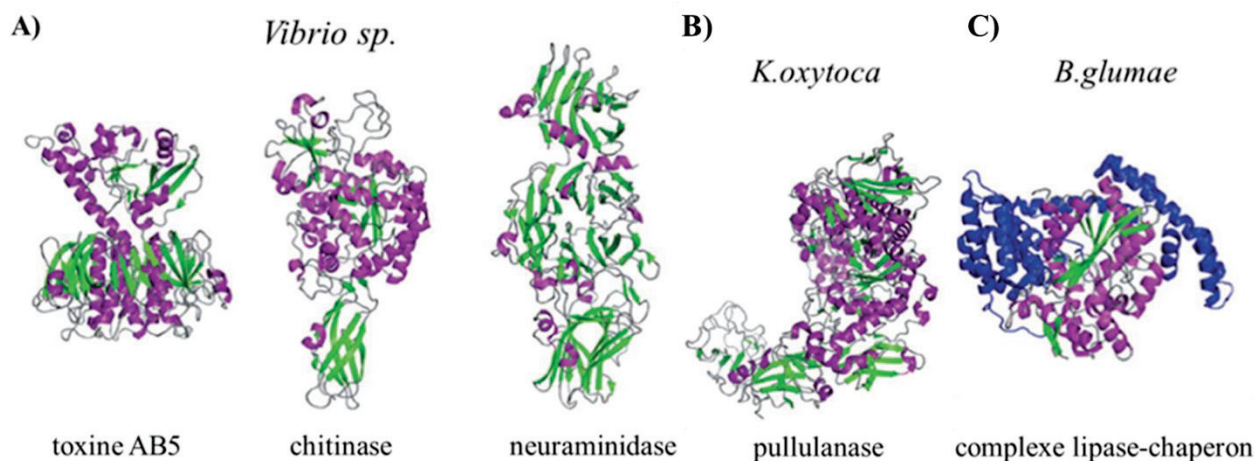


Figure 80. Substrats sécrétés par divers T2SS.

Substrats sécrétés par A) *Vibrio sp.* B) *K. oxytoca* et C) *Burkholderia glumae*. Les éléments structuraux sont représentés par les couleurs suivantes : des brins- β en vert et des hélices- α en violet. Le chaperon est présenté en bleu (d'après Korotkov *et al.*, 2012).

Chez *D. dadantii*, les structures de sept protéines sécrétées par le système Out ont été résolues (Figure 81). Certains de ces substrats possèdent des protéines orthologues chez une bactérie proche de *D. dadantii*, *P. carotovorum*.

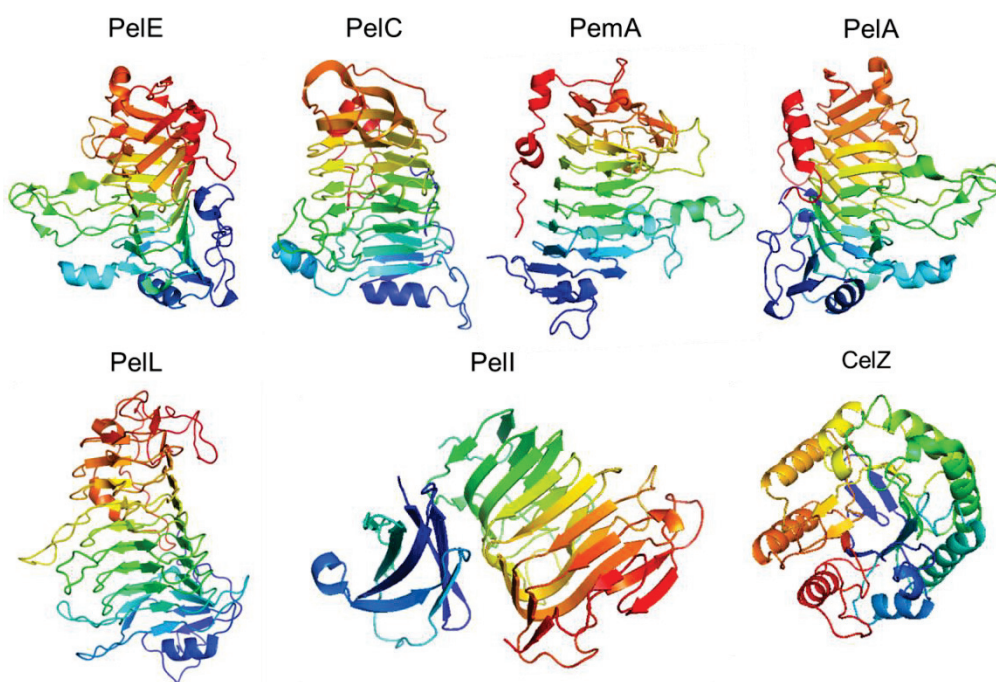


Figure 81. Structures des protéines sécrétées par le système Out de *D. dadantii*.

PelE (UniProtKB : P04960, Yoder *et al.*, 1994), PelC (1AIR ; Lietzke *et al.*, 1996), PemA (1QJV, Jenkins *et al.*, 2001), PelA (1JRG, Thomas *et al.*, 2002), PelL (1RU4 ; Jenkins *et al.*, 2004), CelZ (1EGZ, Chapon *et al.*, 2005), Pell (3B4N, Creze *et al.*, 2008). La différence des couleurs est en rapport avec la position dans la séquence : la partie N-terminale est colorée en bleu et la partie C-terminale, en rouge.

L'objectif de l'étude.

Le système de sécrétion de type II (T2SS) est largement exploité par les bactéries à Gram négatif pathogènes des plantes, des animaux et de l'homme où il permet la sécrétion de facteurs de virulence (des toxines et des enzymes lytiques). Bien qu'il soit étudié chez de nombreuses bactéries, l'architecture et le mode de fonctionnement de cette nano-machine ne sont pas encore compris. De même, les protéines sécrétées par ce système n'ont pas de motif de sécrétion linéaire commun et en dépit de nombreuses tentatives pour comprendre le mécanisme de reconnaissance des protéines sécrétées, le signal de sécrétion n'a toujours pas été identifié.

L'objectif de ma thèse a donc consisté à rechercher et caractériser des motifs structuraux des protéines sécrétées qui constituent le signal de sécrétion du T2SS et à identifier les composants du système responsables de la reconnaissance de ce signal. Le deuxième axe de mes travaux de thèse avait pour but d'approfondir la connaissance générale sur le mode d'assemblage et de fonctionnement du T2SS en identifiant, en particulier, les interactions mises en jeu entre les composants du système.

Même si le mécanisme exact de la reconnaissance et du recrutement des protéines à sécréter par le T2SS n'est pas connu, des études précédentes suggèrent qu'il peut inclure plusieurs interactions transitoires avec quelques composants du système. Afin de capter et caractériser ces interactions, j'ai utilisé une technique innovante du pontage dirigé *in vivo*. Cette technique consiste à incorporer *in vivo* un analogue photoréactif d'acides aminés à la place d'un résidu présumé constituer ou faire partie du signal de sécrétion. Le pontage réalisé par une exposition des cellules vivantes aux UV va permettre par la suite de coupler la protéine d'intérêt avec ses partenaires. Le principe de cette technique est présenté dans la **Chapitre I**.

Une partie de ma thèse a été consacré à la mise au point de cette approche chez *E. coli* (**Chapitre II.1**) et chez la bactérie modèle *D. dadantii* (**Chapitre II.2**).

D. dadantii est une bactérie phytopathogène qui utilise le système T2SS, appelé Out, pour sécréter des nombreuses pectinases, y compris la pectate lyase Peli, sélectionnée comme modèle d'étude pour la recherche des signaux de sécrétion. J'ai donc appliqué la technique de pontage dirigé d'une manière systématique à la pectate lyase Peli afin d'identifier ces partenaires protéiques lors du processus de sécrétion (**Chapitre III**).

J'ai effectué en particulier le pontage dirigé sur les régions non structurées et les brins β du domaine Fn3 de Peli (**Chapitre III.1**), sur le linker entre deux domaines (**Chapitre III.2**) et sur les régions non structurées du domaine catalytique de Peli (**Chapitre III.3**). Une partie de ces résultats est présentée dans l'article de Pineau *et al.*, 2014 (Annexe II, p.194-247).

La même approche a été utilisée pour rechercher les partenaires d'un des composants du système, la protéine OutC (**Chapitre IV**). Des études précédentes ont suggéré que ce composant serait impliqué dans le recrutement des substrats. Deux domaines périplasmiques d'OutC, PDZ (**Chapitre IV.1**) et HR (**Chapitre IV.2**), ont été analysées par pontage dirigé.

Le pontage dirigé *in vivo* du domaine HR d'OutC m'a permis également de compléter la recherche des interactions entre les composants du système, notamment, entre les régions périplasmique d'OutC et la sécrétine OutD (Wang *et al.*, 2012) (Annexe II, p.248-271) et les interaction d'OutC avec les composants de la membrane interne OutL et OutM (Lallemant *et al.*, 2013) (Annexe II, p.272-294).

Matériel et Méthodes.

Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture.

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés lors de cette étude sont décrits dans la section « Annexe III ». Les souches d'*E. coli* et de *D. dadantii* ont été cultivées, sous agitation, en milieu riche Luria-Bertani (LB) ou en milieu minimum M9 additionné de glucose 0,4 % (pour *E. coli*) ou de glycérol 0,4 % (pour *D. dadantii*), de casamino acides 0,5 % et de *pBpa* 1mM. Lorsque cela était nécessaire, des antibiotiques ont été ajoutés au milieu de culture aux concentrations suivantes : ampicilline (150 µg/mL), chloramphénicol (50 µg/mL pour *E. coli* et 10 µg/mL pour *D. dadantii*), kanamycine (100 µg/ml). Par ailleurs, l'ajout de galacturonate 0,1 % ou d'arabinose 0.3 mg/ml au milieu de culture a permis d'induire l'expression de gènes d'intérêt. Les souches d'*E. coli* ont été conservées à -20°C dans du glycérol 20% (V/V) et celles de *D. dadantii* à -80°C dans du glycérol 40% (V/V).

Méthodes de biologie moléculaire.

Les méthodes d'extraction d'ADN plasmidique par lyse alcaline et d'électrophorèse sur gel d'agarose ont été effectuées selon Sambrook and Russell (2001). Les extractions sur gel d'ADN ont été réalisées par l'utilisation des kits QIAquick (Qiagen) ou Ultraclean (MO BIO) selon les instructions des fournisseurs. Les digestions d'ADN plasmidique et les ligatures pour les clonages ont été réalisées en utilisant les enzymes de restriction, la T4 DNA ligase et les tampons appropriés (New England Biolabs). La mutagenèse dirigée par PCR a été réalisée avec le kit PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa). Les transformations ont été réalisées en utilisant chez *E. coli* le choc thermique sur des cellules rendues compétentes après un traitement au CaCl₂ et chez *D. dadantii* par électroporation.

Pontage dirigé *in vivo*.

Les souches d'*E. coli* ou *D. dadantii* ont été transformées avec le plasmide pSup-BpaRS-6TRN (codant le couple de l'aminacyl-synthétase et l'ARNt nécessaire à l'incorporation du pBpa) et un autre plasmide portant la substitution TAG dans le gène d'intérêt. Les précultures ont été réalisées à 30°C sous agitation pendant la nuit, dans le milieu BL complémenté avec les antibiotiques appropriés. Ensuite, les cellules ont été lavées et diluées jusqu'à la DO₆₀₀ finale de 0,3 dans le milieu minimum M9 additionné de glucose 0,4% (pour *E. coli*) ou de glycérol 0,4% (pour *D. dadantii*), de casamino acides 0,5 % et de pBpa 1mM. De plus, pour induire la synthèse des pectinases et du système Out chez *D. dadantii*, du galacturonate 0,1 % a été ajouté. Après 4 ou 8 heures de croissance, une partie de la culture (2 mL) a été prélevée et placée sur la glace (contrôle négatif) et une autre partie de cellules (2 mL) a été déposée dans les boîtes de Pétri en verre et exposées aux UV (l'appareil Bio-Link BLX, 365 nm) pendant 3 min à une distance de 10 cm. Ensuite, les cellules ont été collectées, lavées dans l'eau et reprises dans 1/10 du volume initial dans 1mM EDTA, 1 % SDS et 0,1mM PMSF. Ensuite les échantillons ont été additionnés d'un quatrième du volume du tampon de lyse (150 mM Tris-HCl pH 6,8, 3% SDS, 10 % glycérol, 20% β-mercaptoéthanol et bleu de bromophénol 0.04%), incubés 5 à 10 min à 100 °C, déposés sur gel SDS-PAGE et analysés par immunodétection avec des anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt.

Pour contrôler que le pontage dirigé chez *D. dadantii* a été réalisé au moment de la sécrétion, une partie de la culture a également été prélevée avant l'exposition aux UV et utilisée pour réaliser le test de sécrétion de la façon suivante : les cellules ont été précipitées par centrifugation pendant 2 min à 10000 g et les fractions cellulaires et les surnageants ont été analysés par immunodétection avec les anticorps dirigés contre les pectate lyases PelI et PelD. La quantité de protéines détectée dans le surnageant indique l'efficacité de la sécrétion.

Analyse des protéines.

La séparation des protéines par SDS-PAGE a été habituellement effectuée selon Laemmli (1970). Les gels de séparation de 9, 10, 12 et 15 % ont été combinés avec le gel de concentration à 4%. Pour certaines expériences, ces gels ont été additionnés d'urée 6 M.

Dans certaines expériences, la séparation des protéines a été effectuée par Tricine-SDS-PAGE (Schägger, 2006) additionné ou non d'urée 6 M.

Réactifs	Gel de séparation de 9%	Gel 4% de concentration
Urée	3,6 g	1,8 g
Tampon 3M Tris-HCl pH 8.5, 0.3% SDS	3,3 mL	0,25 mL
29:1 acrylamide/bisacrylamide	3 mL	0,75 mL
SDS 10%	100 µL	50 µL
H ₂ O	0,6 mL	2,5 mL
<i>Persulfate d'ammonium</i> 10%	70 µL	35 µL
TEMED	8 µL	5 µL

Afin de mieux séparer les protéines situées dans la zone entre 55 et 75 kDa, le gel de gradient de 5-12 % tris-acétate a également été utilisé (Cubillos-Rojas *et al.*, 2010).

En général, les échantillons ont été additionnés d'un quatrième du volume du tampon de lyse 150 mM Tris-HCl pH 6.8, 3% SDS, 10 % glycérol, 20% β-mercaptoéthanol et bleu de bromophénol 0.04% et incubés 5 à 10 min à 100 °C avant dépôt sur gel.

Afin de visualiser les protéines, les gels ont été colorés à l'aide d'une solution de 2,5g/L bleu de Coomassie G250, 10 % d'acide acétique et 40 % d'éthanol, puis décolorés a été dans une solution d'acide acétique (8%).

Pour l'immunodétection, les protéines ont été transférées d'un gel sur une membrane PVDF (ImmobilonP, 45 µm, Millipore) à l'aide d'un appareil de transfert demi-sec (Transblot Biorad) dans du tampon glycine 40 mM, Tris 50 mM, SDS 0,1%, méthanol 10% à ampérage constant (100mA/gel) pendant 30 min. Après le transfert, la membrane a été saturée dans une solution de gélatine à 3% pendant 1 h à 30°C. Ensuite, la membrane a été lavée avec le tampon TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl, 0,1% Tween-20) et incubée 1 h avec les solutions des anticorps primaires dilués selon les concentrations suivantes dans le TBS-T (anti-OutC 1:6000, anti-OutD 1:4000, anti-PelB 1:6000, anti-PelI 1:10000, anti-PelD 1:4000, anti-OutG 1:4000 et anti-OutK 1:3000). La membrane a été lavée trois fois 7 min avec du TBS-T et incubée 1 h avec une solution contenant des anticorps secondaires couplés à la peroxydase (dilution 1/60000 dans TBS-T). Cette étape a été suivie de trois lavages de 7 min au TBS-T. Enfin, la révélation a été effectuée selon le principe de chimiluminescence grâce au kit ECL Immobilon WesternTM (Millipore). La peroxydase catalyse l'oxydation du luminol présent dans les réactifs du kit, cette

réaction s'accompagne d'une émission de lumière détectable par une exposition sur un film autoradiographique.

Fractionnement cellulaire.

Pour déterminer la localisation cellulaire de complexes générés par le pontage après l'exposition aux UV, les cellules ont été collectées de boîtes de Petri, centrifugées 2 min à 10 000 rpm, lavées dans le tampon TBSE (50 mM Tris HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA), reprises dans le même tampon puis cassées par sonication et centrifugées à 16 000 g pendant 5 min pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été centrifugé à 40 000 g pendant 2 h pour séparer la fraction soluble de la fraction membranaire. La quantité du matériel de chacune des fractions correspondant à DO600 de 3,2 a été déposée sur SDS-PAGE et analysée d'une part par l'immunodétection et d'autre part par la coloration au Bleu de Coomassie dans le but de choisir la fraction qui contient le plus de complexes spécifiques et le moins de protéines contaminantes.

Immunoprécipitation.

Pour l'immunoprécipitation de complexes formés grâce au pontage dirigé, les manipulations ont été réalisées à 15 °C. Les anticorps dirigés contre Pell ont été fixés de façon non covalente sur la résine de Protein A Sepharose CL-4B (GE Healthcare Life Sciences) : 0,25 mg de la résine équilibrée avec le tampon IP (50 mM Tris HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA et 0,1% NP-40) a été mélangée avec 20 µL d'antisérum dirigé contre Pell et agitée pendant 3 h sur une roue tournante (12 rpm). Dans les autres expériences, certains de ces paramètres ont été variés : la quantité d'antisérum dirigé contre Pell (10, 20, 30, 40 µL) et de la résine (0,125, 0,25 et 0,5 mg). Ensuite, la résine portant les anticorps fixés a été précipitée par centrifugation pendant 2 min à 4000 g et des lavages (3 au total) ont été effectués par l'addition de 2 mL de tampon IP et l'incubant de ce mélange 5 min sur la roue tournante (12 rpm). Ensuite, la résine portant les anticorps fixés a été mélangée avec la fraction cellulaire contenant les complexes d'intérêt (solubilisée dans 200 µL de tampon TBSE contenant 1% de NP-40 ou dans 100 µL TBSE contenant 0,6% de SDS et ensuite dilué avec le tampon IP jusqu'au 2 mL pour 0,25 mg de la résine) et l'immunoprécipitation a été réalisée par agitation pendant 5 h sur la roue tournante (12 rpm). Après l'incubation, la résine a été précipitée par centrifugation (2 min à 4000 g), lavée trois fois avec du tampon IP (2 mL par 0.25 mg de la résine) et les complexes fixés sur la résine ont ensuite été élués par une solution de 40 mM Tris HCl pH 6.8, 5 % de β -mercaptoéthanol, 0,8 % de SDS, 5 % de glycérol, ou par une solution de 50 mM Tris HCl pH 8.0, 0,2% de SDS et 0,2% de NP-40.

Les complexes ont été séparés par le SDS-PAGE 9 % et soit colorés au bleu de Coomassie G250, soit analysés par immunodétection avec les anticorps dirigés contre Pell et OutD. Lors de l'immunodétection, afin d'éviter une fixation massive des anticorps secondaires sur les chaînes lourdes des anticorps dirigés contre Pell, la membrane a été colorée au Rouge ponceau et une partie de la membrane correspondante aux chaînes lourdes des anticorps a été découpée. Enfin, les bandes correspondant aux complexes d'intérêt ont été découpées et envoyées à l'IBCP de Lyon pour identification par LC-MS-MS.

Résultats.

I. Pontage dirigé *in vivo*.

Cette technique a été développée dans le laboratoire de P. Schultz (Farrel *et al.*, 2005). Contrairement à une approche de pontage chimique «classique», qui génère beaucoup des complexes non spécifiques, le pontage dirigé est limité aux résidus sélectionnés. Dans cette approche, l'analogue photoréactif d'un acide aminé, le para-benzoyl-L-phénylalanine (*pBpa*), est incorporé *in vivo* à la place d'un résidu sélectionné. Ensuite, le pontage est activé par une courte irradiation des cellules vivantes aux UV afin de capturer *in vivo* des interactions transitoires. En pratique, un résidu sélectionné dans le gène d'intérêt sera remplacé par un codon non-sens par mutagenèse dirigée. Le plasmide portant un couple ARNt et aminoacyl ARNt synthétase va permettre l'incorporation d'un agent photoréactif, le *pBpa* (ajouté dans le milieu de culture) dans cette position *in vivo*.

Le *pBpa* est une molécule qui, suite à une irradiation par rayons UV de 350-365 nm, peut être activée et forme un biradical. Cette forme active peut interagir avec des liaisons C-H de molécules localisées à proximité de 4 Å et former une nouvelle liaison covalente (Figure 1).

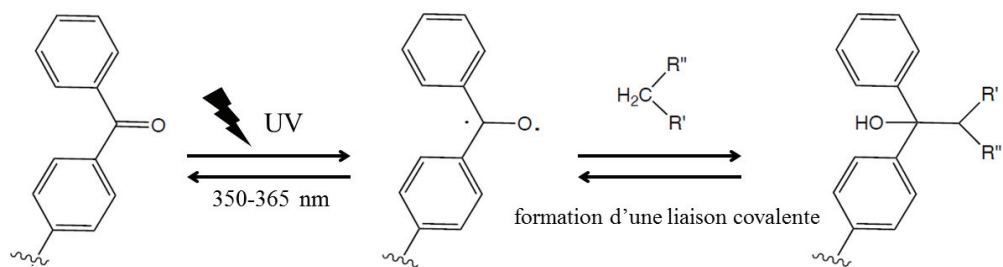


Figure 1. Mécanisme réactionnel du *pBpa*.

Pour permettre l'incorporation du *pBpa* *in vivo*, le codon TAG a été choisi comme le codon non-sens le plus rarement utilisé chez les bactéries (présent dans 7 % des gènes) (Wang *et al.*, 2001). L'ARNt Tyr et la tyrosyl-ARNt-synthétase (TyrRS) de *Methanocaldococcus jannaschii* ont été modifiés dans le but de reconnaître le codon non-sens et le *pBpa*, ce qui permet l'incorporation de cet analogue photoréactif dans les protéines *in vivo* (Chin *et al.*, 2002). La construction d'un vecteur pSup-BpaRS-6TRN qui porte six copies du gène de d'ARNt spécifique du *pBpa* et le gène de *pBpa*-ARNt-synthétase sous un promoteur fort a permis d'augmenter la spécificité et efficacité de l'incorporation du *pBpa* (Ruy & Schultz, 2006).

En effet, l'incorporation du *pBpa in vivo* s'effectue en parallèle d'un processus de traduction classique (Figure 2A).

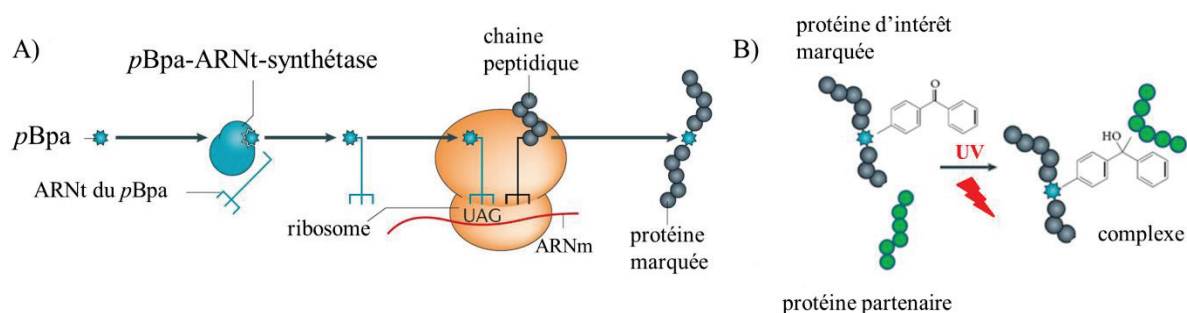


Figure 2. Incorporation du *pBpa in vivo* et pontage UV.

(A) *pBpa* (indiquée avec une étoile bleue) est reconnue par la *pBpa*-ARNt-synthétase (en bleu) qui réalise l'acylation de l'ARNt spécifique avec le *pBpa*. L'ARNt transfère le *pBpa* vers le ribosome, interagit avec le codon UAG dans l'ARNm, ce qui permet l'incorporation du *pBpa* dans la chaîne peptidique et la production de la protéine d'intérêt marquée (en gris). (B) L'irradiation par UV permet la formation d'un complexe entre la protéine d'intérêt et son partenaire (en vert).

En conclusion, ce système composé d'un codon TAG, d'un ARNt spécifique du *pBpa* et la *pBpa*-ARNt-synthétase permet la production d'une protéine d'intérêt marquée au *pBpa* qui peut être couplée à ses partenaires de manière covalente par pontage UV (Figure 2B).

II. Mise au point de la technique de pontage dirigé *in vivo*.

La technique de pontage dirigé *in vivo* a été développée et utilisée chez *E. coli* pour démontrer notamment les interactions transitoires au cours de la sécrétion par le T5SS ou encore du tranlocon Sec (Mori & Ito, 2006 ; Das & Oliver, 2011 ; Yu *et al.*, 2013). Cependant, pour chaque cas particulier, cette technique a nécessité des mises au point pour trouver les meilleures conditions de production de la protéine marquée, le temps de croissance optimal, le temps d'exposition des cellules aux UV etc. De manière générale, les vecteurs plasmidiques et des constructions génétiques utilisées chez *E. coli* sont utilisables chez *D. dadantii*. On pourrait donc s'attendre à ce que les plasmides portant un couple d'ARNt et amino-acyl ARNt synthétase soient aussi utilisables chez *D. dadantii*. Néanmoins, certains paramètres expérimentaux définis chez *E. coli* nécessiteront d'être ajustés pour *D. dadantii*, comme, par exemple, les conditions d'expression, le temps d'exposition des cellules aux UV etc. De plus, l'un des défis majeurs consiste à effectuer le pontage-UV au moment de la sécrétion active.

II.1. Mise au point de la technique de pontage dirigé *in vivo* chez *E. coli*.

Tout d'abord, nous avons utilisé la technique de pontage dirigé *in vivo* chez *E. coli*. Comme nous ne disposions pas d'un plasmide permettant l'expression d'un système Out entier et fonctionnel chez *E. coli*, nous avons construit et utilisé les plasmides co-exprimant les protéines

sécrétées (PelI ou PelB) avec un ou plusieurs composants du système de sécrétion (OutC, OutD, OutE, OutL, OutM et OutS) (Figure 5). Nous avons considéré que ces constructions allaient permettre de détecter certaines interactions essentielles entre une protéine sécrétée et les composants du système. De plus, ceci nous a permis de tester plusieurs souches, milieux et conditions de culture pour permettre l'incorporation spécifique et efficace du *pBpa* à la place de résidus choisis.

Plusieurs souches d'*E. coli* utilisées couramment au laboratoire portent une mutation *supE* qui est responsable de la suppression du codon stop TAG. Cette mutation peut aussi apparaître spontanément dans les souches non-suppresseurs. Ceci peut diminuer l'efficacité d'incorporation du *pBpa* et, en conséquence, réduire la production de la protéine marquée. Ainsi, trois souches d'*E. coli* non-répresseurs ont été testées en parallèle avec la souche NM522 qui possède la mutation *supE* (Figure 3). L'efficacité de l'incorporation a été estimée pour la production du variant PelI V65*pBpa*.

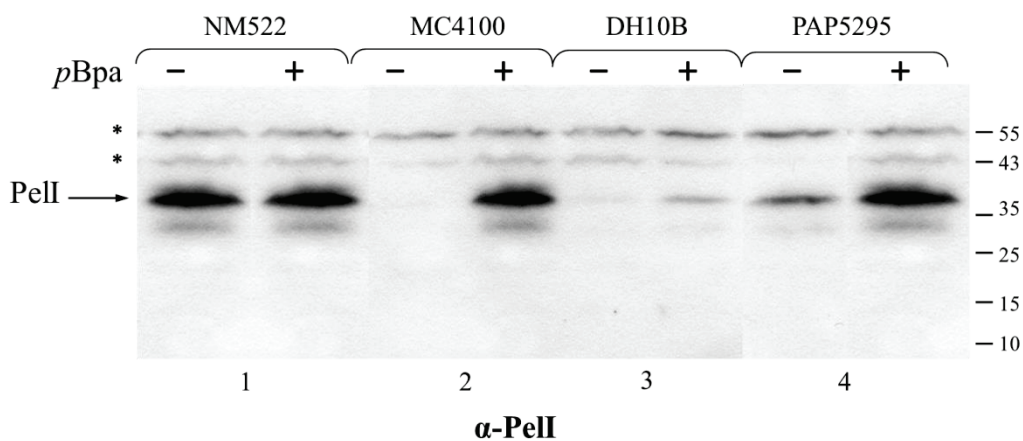


Figure 3. Efficacité de l'incorporation du *pBpa* dans PelI chez les différentes souches d'*E. coli*.

Les souches (indiquées en haut) ont été transformées avec les deux plasmides : pSup-BpaRS-6TRN (codant le couple de l'aminocyl-synthétase et l'ARNt nécessaire à l'incorporation du *pBpa*) et pBS :*pelI*_{V65TAG} codant la pectate lyase PelI avec le codon TAG à la place de V65. Les cellules ont été cultivées dans le milieu riche BL en absence (-) ou en présence (+) de 1mM de *pBpa* et analysées par immunodétection avec les anticorps dirigés contre PelI. La position de la protéine PelI est indiquée avec une flèche, les bandes non spécifiques, avec les étoiles.

Dans le cas de la souche NM522 (Figure 3, piste 1), on détecte la protéine PelI en présence comme en absence du *pBpa*, car cette souche possède une mutation *supE* permettant la suppression du codon-stop TAG. La souche DH10B, quant à elle, produit très peu de la protéine d'intérêt (Figure 3, piste 3). Dans le cas de la souche PAP5292 (Figure 3, piste 4), une translecture traductionnelle « read through » est détectée, qui consiste en la production de la protéine même en absence du *pBpa* dans le milieu grâce à la suppression partielle du codon-stop.

En revanche, l'incorporation du *pBpa* est très efficace et spécifique chez la souche MC4100 (Figure 3, piste 2). Donc, la souche d'*E. coli* MC4100 a été choisie pour les tests suivants.

Ensuite, différents milieux ont été testés afin de choisir les conditions optimales de la production de la protéine marquée chez la souche MC4100. Le milieu riche BL, le milieu minimum M9 additionné de glucose seul ou avec des casamino acides ont été testés (Figure 4).

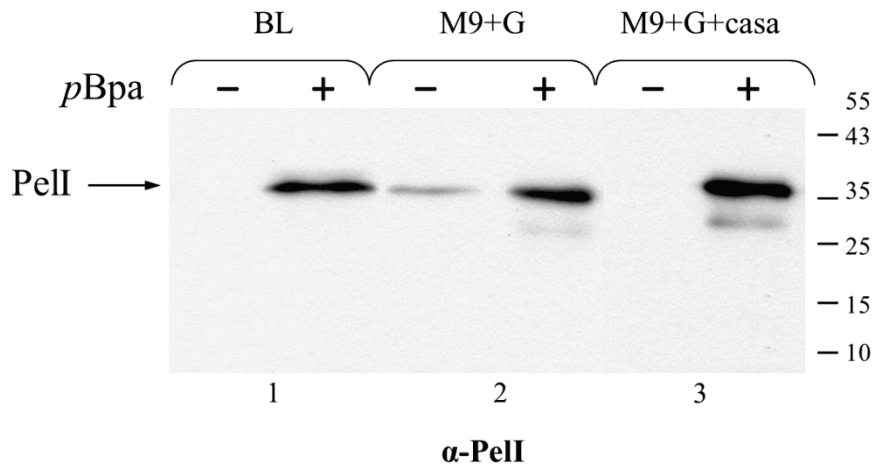


Figure 4. Efficacité de l'incorporation du *pBpa* chez *E. coli* MC4100 dans milieux différents.

Les cellules d'*E. coli* MC4100 ont été transformées avec les deux plasmides : pSup-BpaRS-6TRN et pBS:*pell*_{V65TAG}, et cultivées dans le milieu BL (1) ou M9 additionné de glucose 0,4 % seul (2) ou avec de casamino acides 0,5 % (3) et en absence (-) ou en présence (+) de de *pBpa* 1mM. Les cellules ont été lysées et analysées par immunodétection avec les anticorps dirigés contre PelI. La position de la protéine PelI est indiquée avec une flèche.

Ce test nous a permis de choisir comme milieu standard pour les expériences de pontage dirigé *in vivo* le milieu minimum M9 additionné de glucose et de casamino acides. Le niveau de la production de PelI marquée a été plus important dans ces conditions, par rapport au milieu BL, où on a détecté un peu moins de PelI (Figure 4, comparer piste 3 et 1). En présence du glucose comme source de carbone unique, l'effet de translecture traductionnelle a été observé (Figure 4, piste 3). De plus, les tests suivants ont démontré que le pontage dirigé est plus efficace dans un milieu minimum que dans un milieu riche.

Le but de cette étude était d'identifier les partenaires de PelI, une protéine sécrétée par le T2SS de *D. dadantii*. Puisque *E. coli* MC4100 ne possède pas de ce système de sécrétion, l'étape suivant a nécessité de construire les vecteurs qui co-expriment le gène *pell* avec les gènes de certains composants du T2SS. Les travaux antérieurs ont identifié la sécrétine OutD et la protéine OutC comme les composants étant impliqués dans l'interaction avec le substrat. De plus, ces deux composants font des multiples interactions entre eux et représentent une unité

fonctionnelle. En effet, chez *P. aeruginosa*, une paire de gènes *xphA/xqhA* code un couple de GspC/GspD orphelins qui peuvent s'associer avec les autres composants du T2SS principal (Michel *et al.*, 2007). Ainsi, tout d'abord, un vecteur co-exprimant les gènes *outC*, *outD* et *outS* a été construit (Figure 5B). La co-expression de la pilotine OutS avec la sécrétine OutD est indispensable pour l'assemblage de cette dernière dans la membrane externe. Le vecteur qui n'exprime que le gène *pell* avec la substitution TAG (Figure 5A) a été utilisé comme contrôle négatif. Par ailleurs, le vecteur exprimant les composants de la membrane interne OutL et OutM avec l'ATPase OutE a été aussi utilisé et co-exprimé avec le vecteur portant *pell*, *outC*, *outD* et *outS* (Figure 5C).

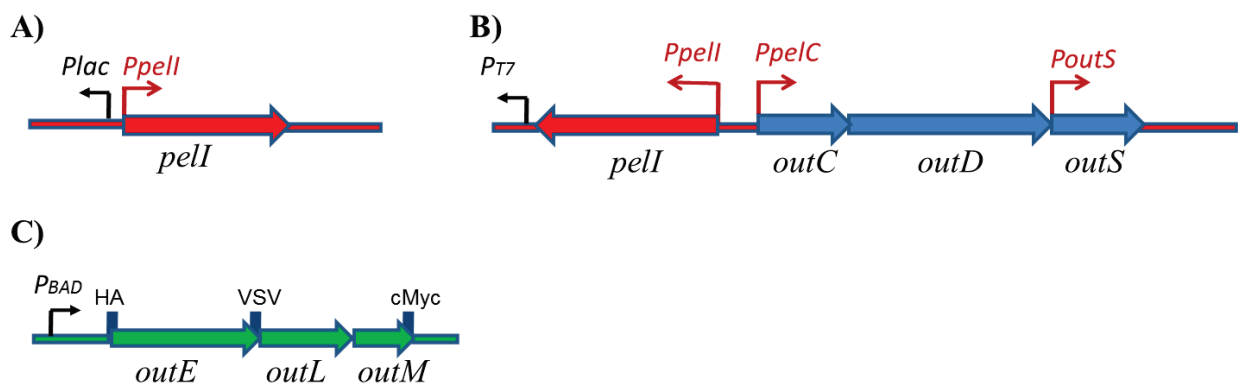


Figure 5. Représentation schématique de vecteurs utilisés dans ce travail.

A) le plasmide Bluescript KS+ portant le gène *pell* cloné sous le contrôle de son propre promoteur. B) le plasmide pTdB-PLI-oCDS a été construit à partir du pT7-6. Il contient le gène *pell* cloné sous son propre promoteur, le couple fonctionnel *outC/outD* sous le contrôle du promoteur *pelC* et le gène *outS* qui code une pilotine indispensable pour l'assemblage de la sécrétine OutD dans la membrane externe. C) le vecteur pBAD portant les gènes de composants de la membrane interne OutL et OutM et l'ATPase OutE qui peut être co-exprimé avec le vecteur montré en (B).

La prochaine étape a été de choisir un temps optimal de l'irradiation par UV. Pour cela, j'ai testé quatre temps d'exposition différents : 3, 6, 10 et 20 min. Les cellules ont été cultivées dans le milieu minimum M9 additionné de glucose 0,4 %, de casamino acides 0,5 % et de *pBpa* 1mM. Une partie de culture a été prélevée avant l'irradiation (temps 0), et ensuite, les cellules ont été déposées dans les boîtes de Pétri en verre et exposées aux UV de 365nm. Les cellules ont été ensuite collectées et analysées par immunodétection (Figure 6).

Le temps de 3 minutes a été choisi comme le temps optimal de traitement, car il a permis de détecter plus de complexes spécifiques. Les durées plus élevées d'irradiation ont provoqué la formation des traînées et des complexes de grande masse moléculaire. Ainsi, après 20 minutes d'irradiation, la totalité de matériel a resté dans les puits du gel SDS-PAGE (Figure 6).

En conclusion, la technique de pontage dirigé a été mise au point chez *E. coli*. Les conditions suivantes ont été choisies et utilisées par la suite : la souche *E. coli* MC4100 a été utilisée pour l'incorporation de *pBpa* réalisée dans le milieu minimum M9 additionné de glucose 0,4 %, de casamino acides 0,5 % et de *pBpa* 1mM. Le pontage dirigé a été réalisé grâce à l'exposition de cellules aux UV de 365 nm pendant 3 min.

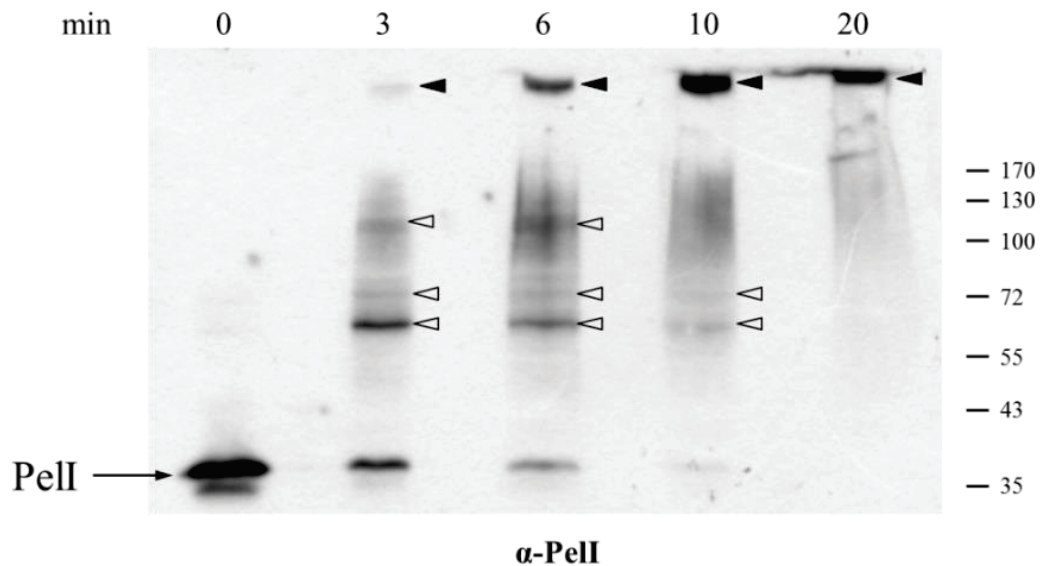


Figure 6. Mise au point du temps d'exposition aux UV chez *E. coli*.

Les cellules d'*E. coli* MC4100 portant les deux plasmides, pSup-BpaRS-6TRN et pTdB-PLI_{V65TAG}-oCDS, ont été cultivées dans le milieu M9 avec de glucose 0,4 %, de casamino acides 0,5 % et de *pBpa* 1mM et ont ensuite été exposées aux UV de 365 nm pendant les temps différents : 3, 6, 10 et 20 min. La même quantité de cellules non traitées a été utilisée comme control négatif (temps 0). Les cellules ont été collectées et analysées par immunodétection avec les anticorps dirigés contre Pell. Les complexes formés par Pell V65*pBpa* sont indiqués avec les triangles blancs. Des complexes de grande masse moléculaire formés suite à une longue irradiation par UV sont indiqués avec un triangle noir.

II.2. Mise au point de la technique de pontage dirigé *in vivo* chez *D. dadantii*.

Pour utiliser la technique de pontage dirigé *in vivo* chez *D. dadantii*, c'est-à-dire, dans les conditions du système de sécrétion fonctionnel, le point le plus important était d'assurer la réalisation du pontage par irradiation de cellules au cours de la sécrétion. Pour induire le T2SS de *D. dadantii*, on utilise le galacturonate, un de composants majeurs de la pectine qui fait partie de la paroi des plantes. Au cours de l'invasion, *D. dadantii* produit une petite quantité d'enzymes pectinolytiques de manière constitutive ce qui provoque la dégradation de la pectine. Le galacturonate ainsi libéré est transporté à l'intérieur de cellules bactériennes et permet l'induction de gènes codant des enzymes pectinolytiques et les gènes du T2SS appelé Out. Ensemble, ces événements permettent de synchroniser la synthèse de pectinases et la machinerie de T2SS nécessaire à leur sécrétion. Une des questions principales de cette étude est d'identifier

les composants du système impliqués dans la reconnaissance et le recrutement des protéines à sécréter. Pour répondre à cette question, il faut pouvoir capter les interactions au cours de la sécrétion. On s'est intéressé à la sécrétion de la pectate lyase PelI au cours de temps (Figure 6). Dans ce but, la souche de *D. dadantii* *pelI*⁻ A3776 a été transformée avec les plasmides pSup-BpaRS-6TRN et pBS:*pelI*_{V65TAG}, (comme dans les expériences de pontage) et la progression de la sécrétion des pectate lyases natives, PelD et PelE, et plasmidique, PelI, a été suivie après 2, 4 et 8 heures de croissance (Figure 7). Pour induire l'expression de gènes de pectinases et du T2SS, le galacturonate a été ajouté au milieu.

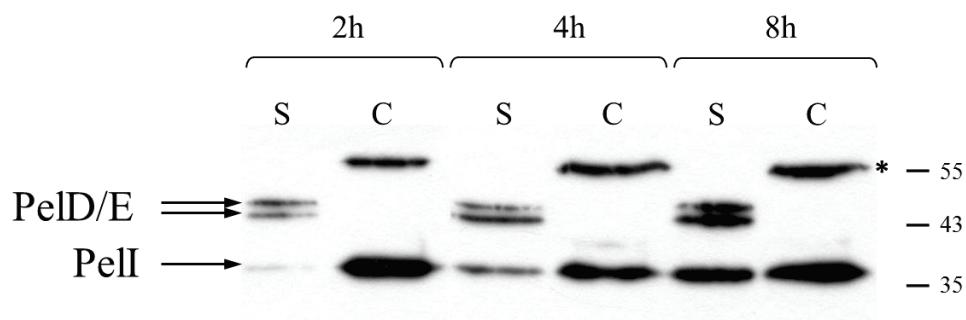


Figure 7. Dynamique de la sécrétion des pectate lyases chez *D. dadantii*.

Les cellules de *D. dadantii* *pelI*⁻ A3776 ont été transformées avec les deux plasmides, pSup-BpaRS-6TRN et pBS:*pelI*_{V65TAG}. Une pré-culture de la nuit a été réalisée en milieu riche BL additionné des antibiotiques. Les cellules ont ensuite été lavées et diluées au cinquième dans le milieu minimum M9 additionné de glycérol 0,4 %, de casamino acides 0,5 %, de galacturonate 0,1 % de *pBpa* 1mM et des antibiotiques appropriés. Pour estimer l'efficacité de sécrétion, les cellules ont été prélevées après 2, 4 et 8 heures de culture et le surnageant de culture (S) a été séparé des cellules (C) par centrifugation. Les fractions S et C ont été analysées par immunodétection avec les anticorps dirigés contre PelI et PelD. La quantité de protéines détectée dans le surnageant (S) indique l'efficacité de la sécrétion. Une bande non-spécifique intracellulaire est indiquée avec une étoile.

On peut constater que les pectate lyases natives PelD et PelE sont efficacement sécrétées tout au long de la culture (Figure 7). Cependant, la sécrétion de PelI marquée par le *pBpa* ne commence que 4 heures après l'induction et au bout de huit heures presque la moitié de cette protéine est sécrétée. Ainsi, le pontage dirigé chez *D. dadantii* peut être réalisé dans l'intervalle de 4-8 heures de croissance quand la sécrétion de PelI marquée par le *pBpa* est maximale. Cette information indique aussi que le niveau d'expression de T2SS est correct car le système se trouve dans son état fonctionnel. Néanmoins, nous avons effectué une expérience similaire pour estimer la dynamique de la production et de pontage d'un variant d'OutC portant le *pBpa* à la place de résidu K239 (le choix de cette substitution est expliqué dans la Chapitre IV.1) (Figure 8). On peut constater que même si la quantité d'OutC marquée augmente tout au long de la culture, le profil du pontage UV reste relativement constant.

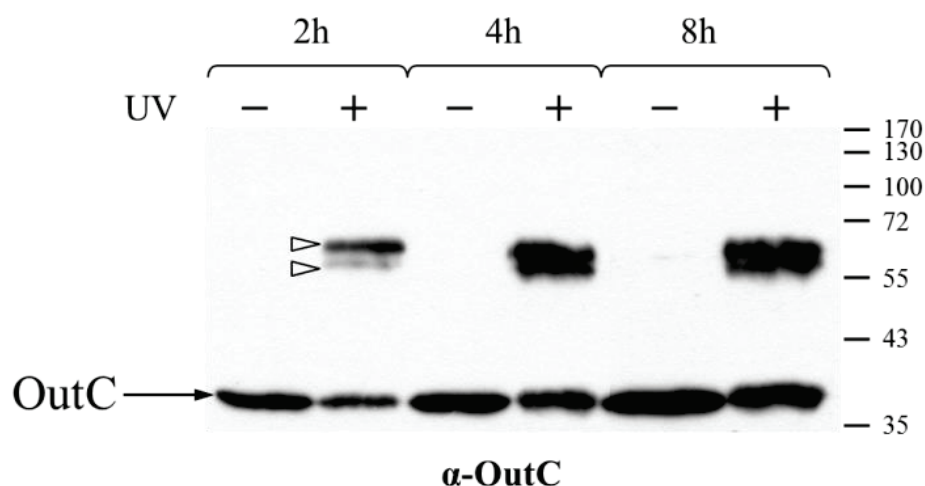


Figure 8. Dynamique de la production et du pontage de variant OutCK239pBpa chez *D. dadantii*.

Les cellules de *D. dadantii pelI⁻* A3776 ont été transformées avec les deux plasmides, pSup-BpaRS-6TRN et pBS:*pell*_{V65TAG}. Une pré-culture de la nuit a été réalisée en milieu riche BL additionné des antibiotiques. Les cellules ont ensuite été lavées et diluées au cinquième dans le milieu minimum M9 additionné de glycérol 0,4 %, de casamino acides 0,5 %, de galacturonate 0,1 % de pBpa 1mM et les antibiotiques appropriés. Pour estimer l'efficacité du pontage UV, les cellules ont été prélevées après 2, 4 et 8 heures de la culture et exposées (+) or non (-) aux UV et ensuite lysées et analysées par immunodétection avec des anticorps contre OutC.

Ainsi, les résultats de ces expériences (Figures 7 et 8) ont justifié le choix du temps de la culture de *D. dadantii* dans l'intervalle de 4 à 8 heures de croissance pour réaliser le pontage dirigé. Néanmoins, dans certaines expériences, le pontage a été effectué deux fois, avec la culture de 4 heures et de 8 heures, pour capter, respectivement, les interactions pendant les étapes précoces et tardives de la sécrétion. En conclusion, un protocole de pontage dirigé chez *D. dadantii* a été établi, il est présenté schématiquement sur la Figure 9.

Afin de détecter des interactions potentielles entre les protéines sécrétées et les composants de T2SS par la technique de pontage dirigé *in vivo*, deux stratégies ont été employées lors de cette étude. La première stratégie consistait à incorporer le pBpa dans une protéine sécrétée d'une manière systématique ou à la place de résidus soupçonnés de faire partie du signal de sécrétion. Cette approche a été majoritairement utilisée avec la pectate lyase PelI afin d'identifier ses partenaires lors de la sécrétion. La deuxième stratégie consistait à utiliser un composant de T2SS comme cible pour incorporer le pBpa et réaliser le pontage-UV par la suite. Cette deuxième stratégie a été majoritairement appliquée pour un composant du système, OutC, soupçonné d'être impliqué dans la reconnaissance de protéines à sécréter. Cette dernière approche peut aider à établir l'implication réelle d'OutC dans le recrutement des substrats et mettre en évidence ses liens avec les autres composants de système.

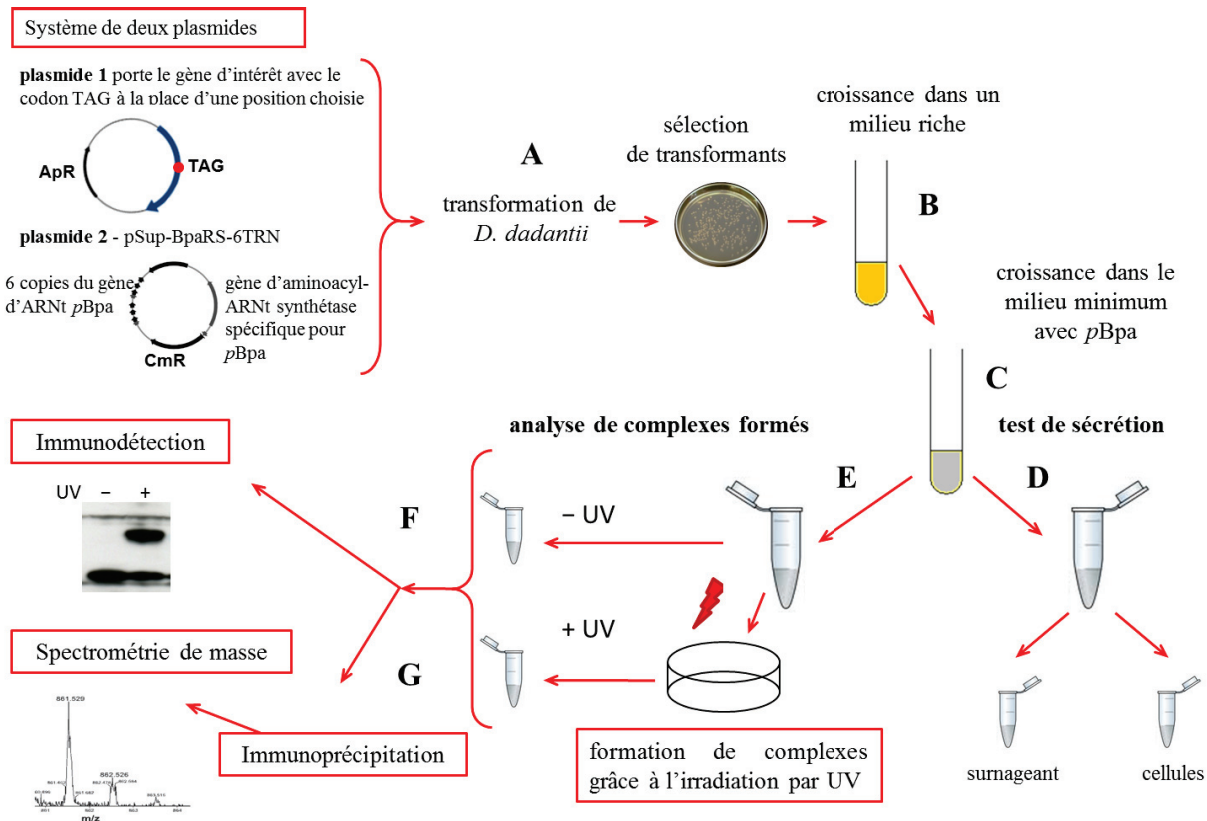


Figure 9. Schéma de pontage dirigé chez *D. dadantii*.

(A) *D. dadantii* est transformée avec deux plasmides : le plasmide 1 porte le gène d'intérêt avec le codon TAG à la place d'un résidu choisi, le plasmide 2 est le plasmide pSup-BpaRS-6TRN qui code un couple d'ARNt et aminoacyl-ARNt synthétase. (B) Après une croissance dans le milieu riche les cellules sont lavées et diluées dans le milieu minimum contenant le pBpa. (C) Après une croissance dans le milieu contenant le pBpa, la culture est séparée en deux portions : (D) pour réaliser le test de sécrétion et (E) pour réaliser le pontage UV. L'analyse de complexes formés est réalisée par immunodétection (F) ou la spectrométrie de masse (G).

III. Pontage dirigé *in vivo* en utilisant la protéine sécrétée Pell.

Tout d'abord, nous avons décidé d'utiliser la première stratégie et donc incorporer le pBpa dans une protéine sécrétée. Le T2SS de *D. dadantii* assure la sécrétion de nombreuses protéines, y compris la pectate lyase Pell. Pell possède deux domaines : le domaine N-terminal Fn3 (de type fibronectine III) et le domaine catalytique C-terminal (Figure 10). *P. carotovorum*, une bactérie proche de *D. dadantii* possède un homologue de Pell, la pectate lyase Pel3. Les deux bactéries utilisent des systèmes Out très similaires pour sécréter plusieurs enzymes dégradatives, souvent très divergentes au niveau structural. Les pectate lyases, Pell et Pel3 ont la même organisation en deux domaines, Fn3 et catalytique, et possèdent 67 % d'identité. Cependant, le système Out de *D. dadantii* ne peut pas prendre en charge et sécréter la pectate lyase Pel3 (Bouley *et al.*, 2001). Ce phénomène suggère les caractéristiques très particulières du système Out : d'un côté, il est capable de sécréter un spectre de substrats très divers, de l'autre côté, il

possède un mécanisme très fin pour distinguer sa propre pectate lyase PelI d'une protéine très similaire, Pel3.

La structure de PelI a déjà été disponible au début de ma thèse (Creze *et al.*, 2008 ; 3B4N) et la structure de Pel3 a été très récemment résolue en collaboration avec l'équipe de l'IBCP de Lyon (Figure 10). Par ailleurs, les travaux récents réalisés au laboratoire ont suggéré que la majorité d'information, différente entre PelI et Pel3 et indispensable pour la sécrétion de PelI, est portée par le domaine Fn3 (Pineau *et al.*, 2014, Annexe II). En particulier, les échanges des domaines entre PelI et Pel3 a démontré que la pectate lyase hybride portant le domaine Fn3 de PelI et le domaine catalytique de Pel3 est efficacement sécrétée tandis que l'hybride inverse ne l'est pas (Figure 2B de Pineau *et al.*, 2014, Annexe II, p.225). Des plus, les analyses réalisées au laboratoire par double hybride bactérien et par résonance de plasmon de surface (RPS) ont démontré que le domaine Fn3 isolé est capable d'interagir avec les domaines périplasmiques d'OutC et OutD (Pineau *et al.*, 2014). Toutes ces données nous a permis d'avoir une stratégie rationnelle pour le choix de résidus dans PelI à incorporer le *pBpa*. Par conséquent, le domaine Fn3 de PelI a été choisi comme la cible principale de cette approche.

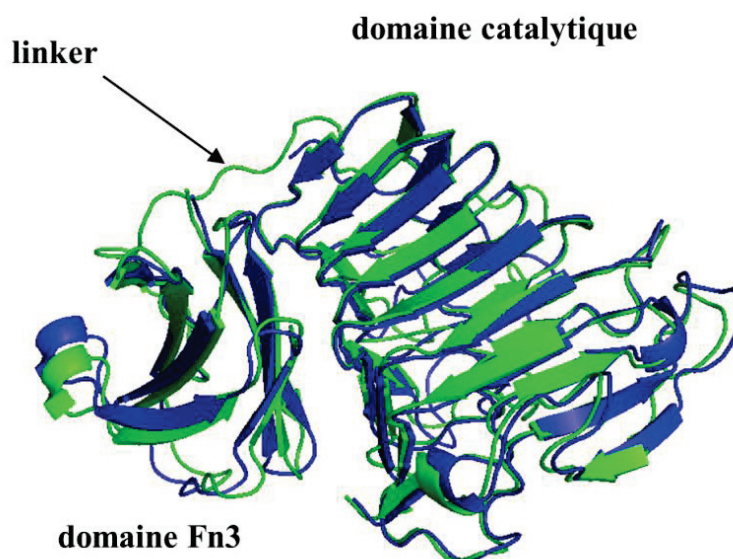


Figure 10. Comparaison de structures tridimensionnelles de pectate lyases PelI et Pel3.

La structure de PelI de *D. dadantii* est présentée en bleu et celle de Pel3 de *P. carotovorum* en vert. Les deux domaines (Fn3 et catalytique) sont connectés par un linker visible uniquement sur la structure de Pel3.

III.1. Pontage dirigé *in vivo* en utilisant le domaine Fn3 de PelI.

Au sein du domaine Fn3 de PelI, 26 résidus ont été sélectionnés pour l'incorporation du *pBpa*. La majorité de ces résidus (17 résidus) est située dans les régions non structurées. Ces régions

ont été exploitées en priorité car elles sont moins conservées entre PelI et Pel3 et bien exposées à la surface. Quelques positions ont été aussi sélectionnées dans les brins β , $\beta 3$, $\beta 4$ et $\beta 6$ qui sont, en général, bien conservées entre PelI et Pel3 (Figure 11). Les résidus du domaine Fn3 qui ont été remplacés par le pBpa sont présentés sur l'alignement de PelI et Pel3 (Figure 11A) et sur la structure du domaine Fn3 de PelI (Figure 11B).

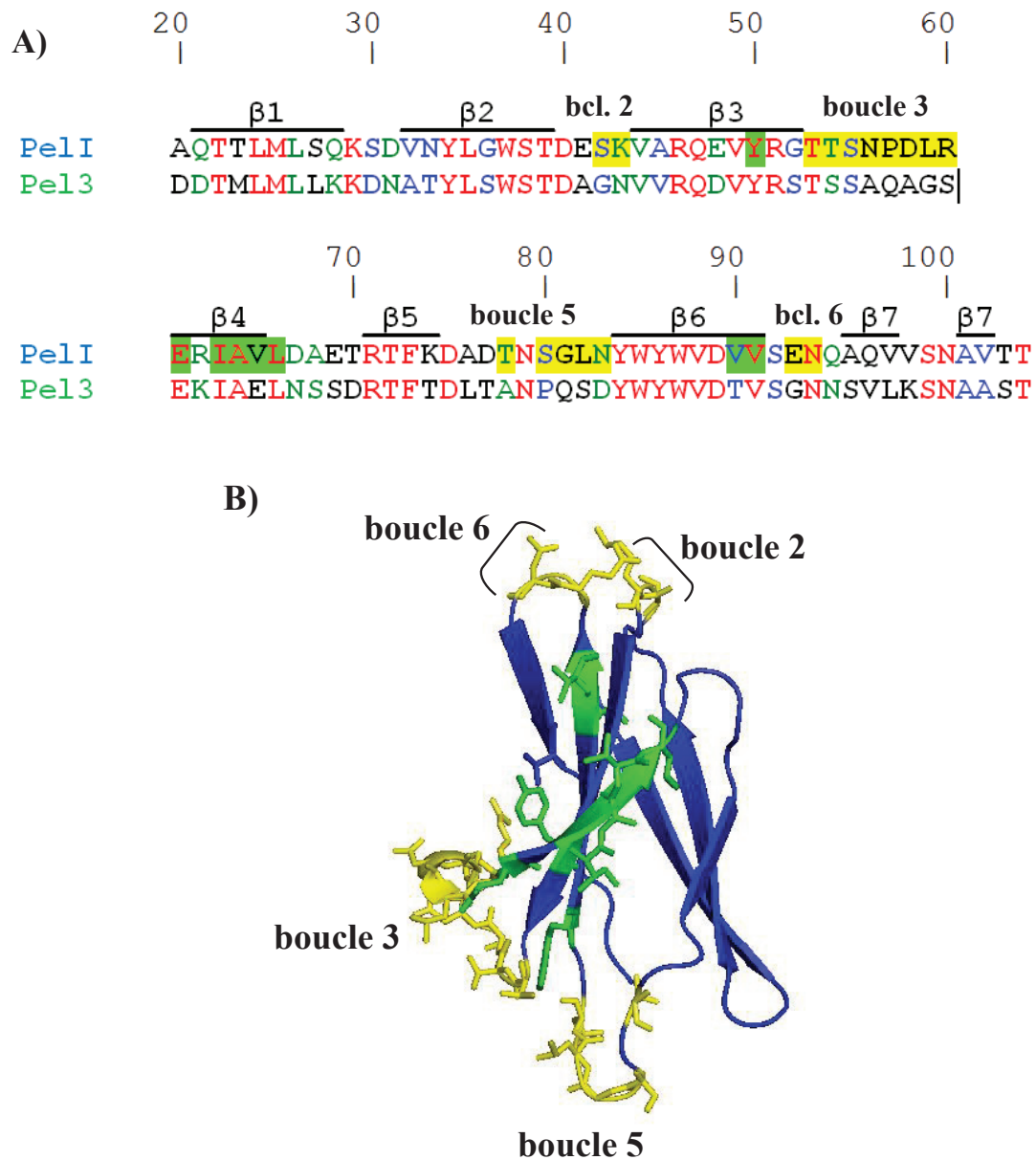


Figure 11. Positions sélectionnées pour l'incorporation du pBpa dans le domaine Fn3 de PelI.

A) Alignement de séquences de domaines Fn3 de pectate lyases PelI et Pel3. Les résidus sélectionnés dans les régions non structurées et moins conservés de PelI sont en jaune. Les résidus sélectionnés dans les brins β sont en vert. B) Structure tridimensionnelle du domaine Fn3 de PelI avec les résidus sélectionnés présentés en jaune et vert.

17 positions ont été choisies dans les régions non structurées du domaine Fn3 de PelI (Figure 11A et 11B ; en jaune) : dans la boucle 2 située entre les brins $\beta 2$ et $\beta 3$ (S42 et K43), dans la boucle 3 située entre les brins $\beta 3$ et $\beta 4$ (T53, T54, S55, N56, P57, D58, L59 et R60), la boucle 5 située entre les brins $\beta 5$ et $\beta 6$ (T78, S80, G81, L82, et N83) et la boucle 6 entre $\beta 6$ et $\beta 7$ (E93 et N94).

9 positions ont été choisies dans les régions structurées du domaine Fn3 de PelI (Figure 11A et 11B ; en vert) : dans le brin $\beta 3$ (Y50), dans le brin $\beta 4$ (E61, I63, A64, V65 et L66), dans le brin $\beta 6$ (W85, V90 et V91).

III.1.1. Pontage dirigé *in vivo* de la boucle 3 du domaine Fn3.

Tout d'abord, j'ai exploité la boucle 3 du domaine Fn3 de PelI. Les expériences réalisées récemment au laboratoire ont suggéré que cette région serait nécessaire à la reconnaissance de PelI par le système Out et pourrait constituer ou faire partie d'un signal de sécrétion (Pineau *et al.*, 2014).

Pour évaluer cette hypothèse, tous les résidus de la boucle 3 ont été substitués par le *pBpa* et la production de ces variants a été analysée chez *E. coli* MC4100 (Figure 12).

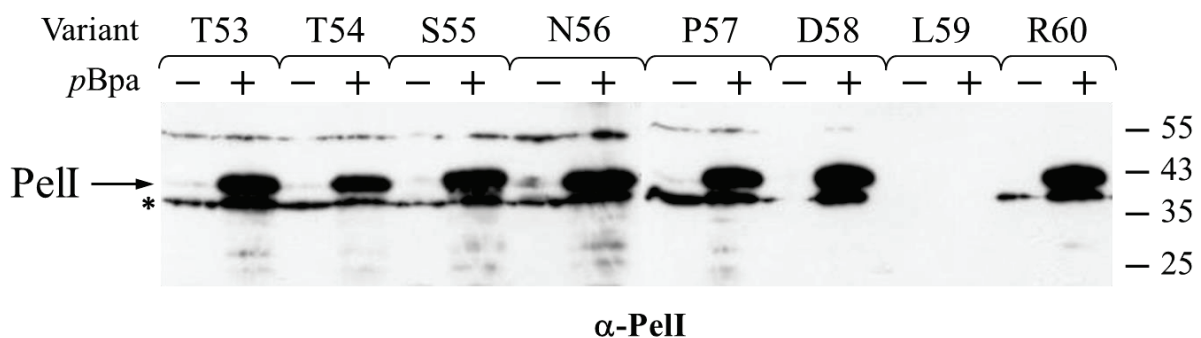


Figure 12. Efficacité de l'incorporation du *pBpa* dans la boucle 3 de PelI.

Les cellules d'*E. coli* MC4100 ont été transformées avec pSup-BpaRS-6TRN et pBS:*pell*_{TAG}. Dans le dernier plasmide, le codon d'un résidu d'intérêt (indiqué en haut) a été substitué par le codon TAG permettant l'incorporation du *pBpa*. Les cellules ont ensuite été cultivées dans le milieu M9 avec de glucose 0,4 %, de casamino acides 0,5 % en absence (-) ou en présence (+) de *pBpa* 1mM et analysées par immunodétection avec les anticorps contre PelI. PelI est indiquée avec une flèche, la bande non-spécifique, avec une étoile.

À l'exception de PelI L59*pBpa*, tous les variants de PelI générés dans la boucle 3, ont été bien produits en présence du *pBpa* (Figure 12, *pBpa* +). Au contraire, en absence du *pBpa* dans le milieu, aucun variant de PelI n'a été produit (Figure 12, *pBpa* -) indiquant que l'incorporation de *pBpa* est efficace et spécifique dans les conditions choisies. Ainsi, ces variants de PelI peuvent être utilisés pour le pontage dirigé *in vivo*.

III.1.1.a. Pontage dirigé *in vivo* chez *E. coli*.

Tout d'abord, le pontage UV a été réalisé chez *E. coli* MC4100 dans deux conditions : les variants de Pell ont été exprimés soit seuls (Figure 5A) soit avec les gènes *outCDS* (Figure 5B). Dans les deux cas, les profils générés lors du pontage-UV ont été très similaires (Figure 13). Même si l'on constate une certaine variabilité de l'intensité de profils observés, aucun complexe additionnel n'a été détecté en présence de OutC, OutD et OutS (Figure 13, comparer A et B).

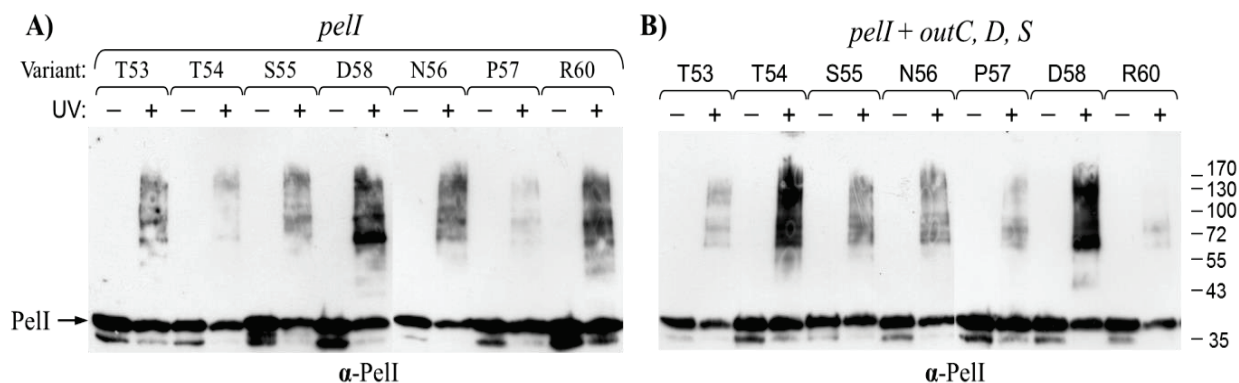


Figure 13. Pontage dirigé *in vivo* de la boucle 3 chez *E. coli* MC4100.

Les cellules d'*E. coli* ont été transformées avec pSup-BpaRS-6TRN et soit pBS-PLI_{TAG} (*pell*, panel A), soit pTdB-PLI_{TAG}-oCDS (*pell* + *outCDS*, panel B). Le résidu de Pell substitué dans un des derniers plasmides est indiqué en haut. Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles indiquées dans Figure 12. Les cellules ont été ensuite prélevées et exposées aux UV pendant 3 min (+) ou non (-) et analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre Pell. La position de Pell est indiquée avec une flèche.

Ces résultats suggèrent que les complexes observés ne sont pas formés grâce à l'interaction entre Pell et OutC ou OutD. Il est donc bien possible que de telles interactions ne peuvent pas s'établir en absence d'autres composants du système ou en absence d'un système fonctionnel complet. Il est connu qu'OutC fait partie de la plateforme de la membrane interne qui inclut aussi les composants OutL et OutM (Py *et al.*, 2001). De plus, une étude récente réalisée au laboratoire a démontré que la co-expression de OutE, OutL et OutM avec OutC et OutD affecte l'organisation et l'arrangement des domaines périplasmiques d'OutC (Wang *et al.*, 2012, Annexe II, p.248-271). Ainsi, afin de mimer certaines interactions au sein du système Out de *D. dadantii*, nous avons complété notre étude par l'ajout de certains composants supplémentaires, notamment, les protéines de la membrane interne OutL et OutM et l'ATPase OutE (Figure 5C). Ainsi, nous avons réalisé le pontage dirigé chez *E. coli* en co-exprimant les variants de Pell avec OutC, OutD et OutS (plasmide pTdB-PLI_{TAG}-oCDS, Figure 5B) et avec les composants OutE, OutL et OutM (plasmide pBAD:ELM, Figure 5C). Cependant, cette approche n'a pas permis non plus de détecter la formation de complexes spécifiques additionnels (résultats non présentés).

Ces résultats montrent que, au moins en l'absence d'un système de sécrétion fonctionnel, les positions analysées dans le domaine Fn3 de PelI n'interagissent pas avec les composants du T2SS testés. Ceci a renforcé la nécessité de mettre au point la technique du pontage dirigé *in vivo* chez *D. dadantii* (voir Chapitre II.2).

III.1.1.b. Pontage dirigé *in vivo* chez *D. dadantii*.

Pour réaliser le pontage dirigé chez *D. dadantii*, nous avons préalablement choisi le temps et les conditions de croissance optimales (Chapitre II.2). Particulièrement, les conditions permettant une meilleure induction du T2SS et la sécrétion des pectinases ont été choisies afin de réaliser le pontage lors d'une sécrétion active. Néanmoins, pour s'assurer que l'exposition aux UV serait faite au bon moment, une partie de la culture utilisée pour le pontage dirigé a été systématiquement prélevée pour réaliser un test de sécrétion en parallèle (Figure 14).

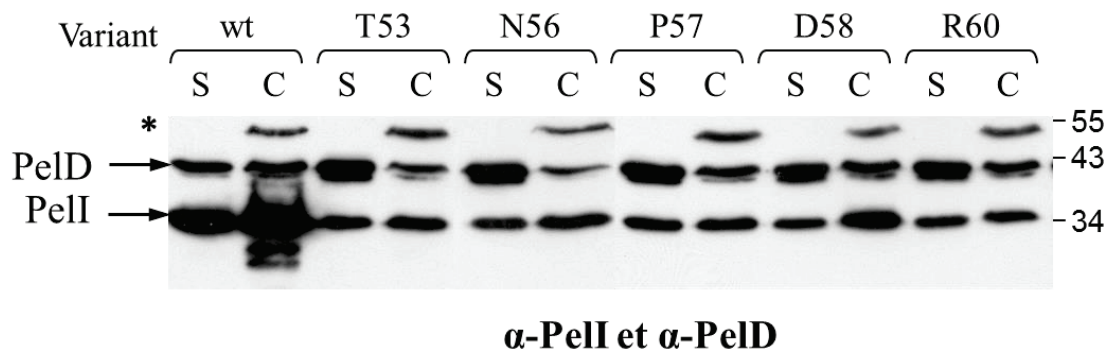


Figure 14. Test de sécrétion de variants de PelI portant le *pBpa* chez *D. dadantii pelI⁻*.

Les cellules de *D. dadantii pelI⁻* A3776 ont été transformées avec pSup-BpaRS-6TRN et pTdB-PLI_{TAG}-oCDS. Les résidus de PelI substitués dans ce dernier plasmide sont indiqués en haut. Les cultures ont été réalisées pendant 8 heures dans les mêmes conditions que celles indiquées dans la Figure 7 et analysées de la même manière par immunodétection avec des anticorps dirigés contre PelI et PelD. La quantité de protéines détectée dans le surnageant (S) indique l'efficacité de la sécrétion. Une protéine non-spécifique (marquée avec une étoile) indique l'absence d'une fuite cellulaire.

Ces tests de sécrétion ont permis de démontrer que tous les variants de PelI portant le *pBpa* à la place de l'un des résidus de la boucle 3 sont plutôt bien sécrétés, même si moins efficacement que la pectate lyase native, PelD (Figure 14). Ceci indique que ces variants de PelI marqués par le *pBpa* seront correctement recrutés par le T2SS et peuvent donc d'être utilisés pour le pontage.

Le pontage dirigé réalisé dans ces mêmes conditions a permis d'observer des complexes formés par l'un de ces variants, PelI D58*pBpa* (Figure 15, lignes 2).

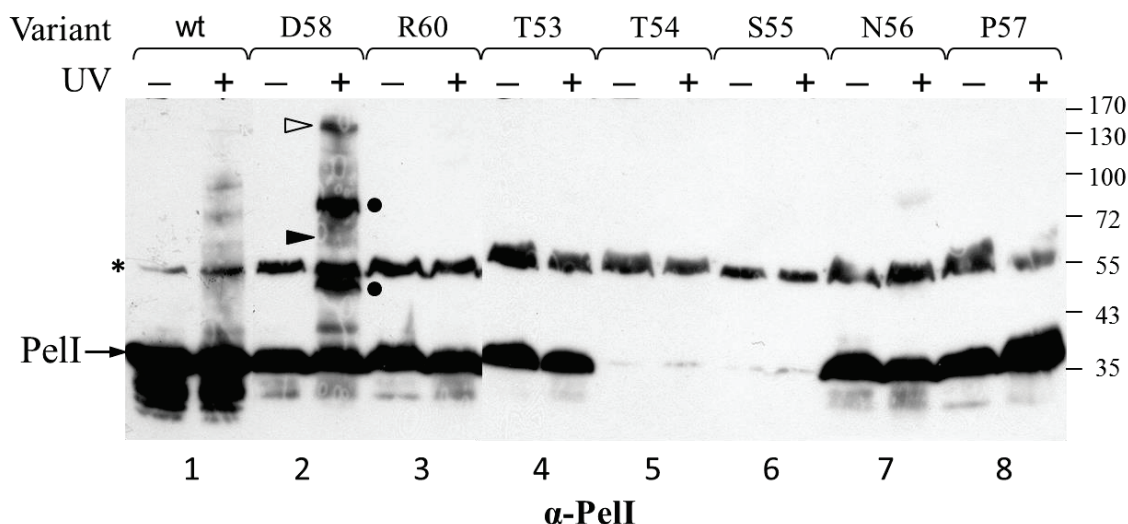


Figure 15. Pontage dirigé *in vivo* chez *D. dadantii pelI*.

Les cultures de *D. dadantii pelI* A3776 portant les mêmes plasmides que dans la Figure 14 ont été aussi réalisées dans les mêmes conditions. Les cellules ont été ensuite prélevées et exposées aux UV pendant 3 min (+) ou non (-) et analysées par immunodétection avec les anticorps contre PelI. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles et les points. La bande non-spécifique est indiquée avec une étoile.

L'analyse de mêmes échantillons avec les anticorps dirigés contre certains composants du T2SS a permis de démontrer qu'un des complexes formés par le variant PelI D58pBpa interagit aussi avec les anticorps dirigés contre OutC (un poids moléculaire de 65 kDa, Figure 16, panel α -OutC) et un autre avec anti-OutD (un poids moléculaire de 140 kDa, Panel α -OutD). Par contre, aucun complexe n'a été observé avec les anticorps dirigés contre OutG ni OutK (panel α -OutG et α -OutK).

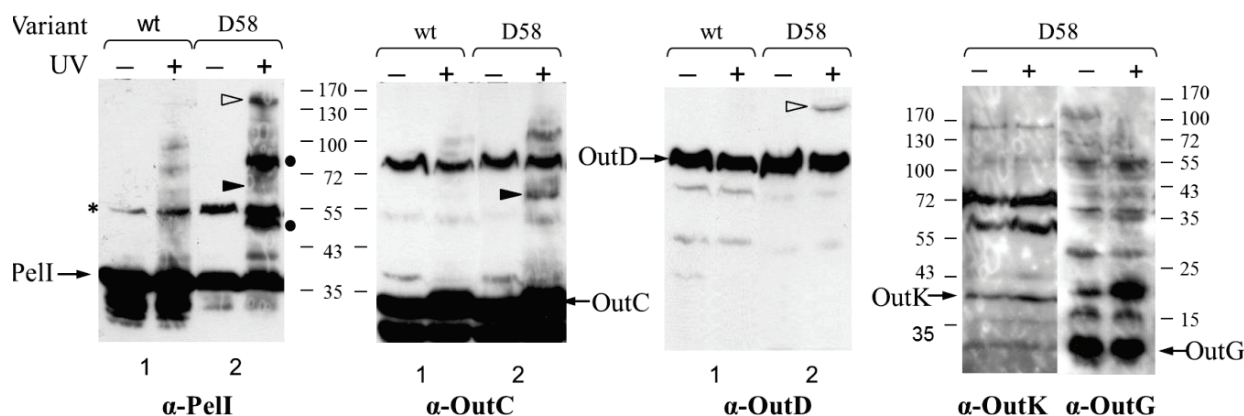


Figure 16. Pontage dirigé du variant PelI D58pBpa chez *D. dadantii*.

Le pontage dirigé avec le variant PelI D58pBpa a été réalisé chez *D. dadantii* dans les mêmes conditions que dans la Figure 15 et analysé avec les anticorps dirigés contre PelI, OutC, OutD, OutK et OutG. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles noirs (PelI-OutC) ou blancs (PelI-OutD) ou encore avec les points (complexes à déterminer). La bande non-spécifique est indiquée avec une étoile.

Il faut aussi indiquer que les variants de Peli portant le *pBpa* à la place de T54 et S55 se sont avérés instables lors de leur expression chez *D. dadantii* (Figure 15) tandis qu'ils ont été bien produits chez *E. coli* (Figure 12). Cet effet peut être causé par des interactions aberrantes de ces variants de Peli avec certains composants du T2SS. Ce phénomène serait donc cohérent avec la formation des complexes avec OutC et OutD par le variant Peli D58*pBpa* portant la substitution d'un résidu proche.

Ainsi, ces expériences de pontage dirigé chez *D. dadantii* ont permis d'identifier un résidu, D58, situé dans la boucle 3 du domaine Fn3 dont la substitution avec le *pBpa* génère des complexes avec les deux composants du T2SS, OutC et OutD. Ces résultats suggèrent l'importance de cette région pour la reconnaissance et/ou le recrutement de Peli par le système Out. La même région de Peli serait donc impliquée dans des interactions avec OutC et la sécrétine OutD. Dans le cas d'OutC, le domaine PDZ a été soupçonné d'être impliqué dans la reconnaissance de substrats de sécrétion (Bouley *et al.*, 2001). Afin de vérifier si le PDZ serait directement impliqué dans l'interaction avec la boucle 3 du Fn3, j'ai réalisé des expériences de pontage avec le variant Peli D58*pBpa* qui a été co-exprimé avec les variants d'OutC possédant le domaine PDZ muté (Chapitre III.1.1.c.). Dans une autre approche, pour déterminer la nature exacte de complexes formés entre Peli-OutC et Peli-OutD, j'ai entrepris une analyse de ces complexes par spectrométrie de masse.

III.1.1.c. Rôle du domaine PDZ d'OutC dans l'interaction avec la boucle 3 du domaine Fn3 de Peli.

Afin de tester si la boucle 3 du domaine Fn3 de Peli interagit directement avec le domaine PDZ d'OutC, j'ai effectué en parallèle le pontage dirigé du variant Peli D58pBpa en le co-exprimant soit avec OutC sauvage soit avec la version OutC mutée, dépourvue du domaine PDZ (Figure 16). Ces expériences ont été réalisées dans une souche de *D. dadantii pelI ΔoutC*.

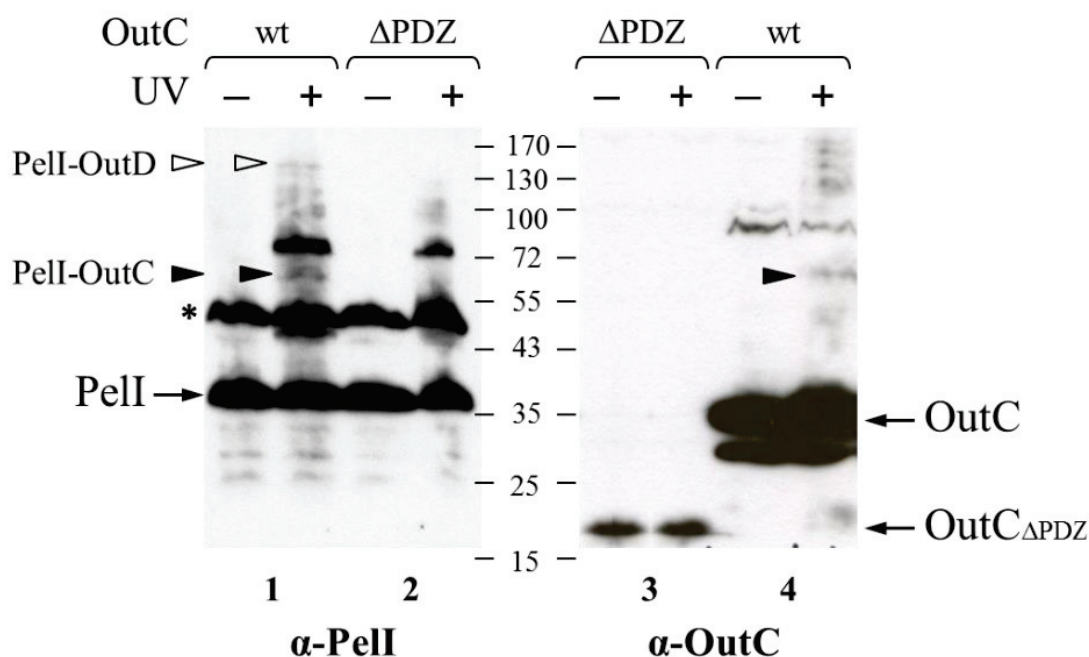


Figure 17. Effet du domaine PDZ sur la formation de complexes par Peli D58pBpa.

Le pontage dirigé avec le variant Peli D58pBpa a été réalisé chez *D. dadantii pelI ΔoutC* en présence soit d'*outC* sauvage (pTdB-PLI_{D58TAG}-oCDS) soit muté (pTdB-PLI_{D58TAG}-oC_{ΔPDZ}DS). Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que dans la Figure 15 et analysées avec les anticorps dirigés contre Peli et OutC. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles noirs (Peli-OutC) ou blancs (Peli-OutD). Les positions de protéines Peli et OutC sont indiquées avec les flèches. La bande non-spécifique est indiquée avec une étoile.

Pour contourner cet obstacle et tester l'implication du domaine PDZ dans l'interaction avec Peli D58pBpa, nous avons utilisé le variant hybride d'OutC, appelé h23 (Figure 18). OutC-h23 possède un domaine PDZ non-fonctionnel suite au remplacement d'une région de R203 à K240 par celle d'OutC de *P. carotovorum* (Figure 18B). OutC-h23 ne permet pas la sécrétion de protéines PDZ-dépendantes (Figure 18C).

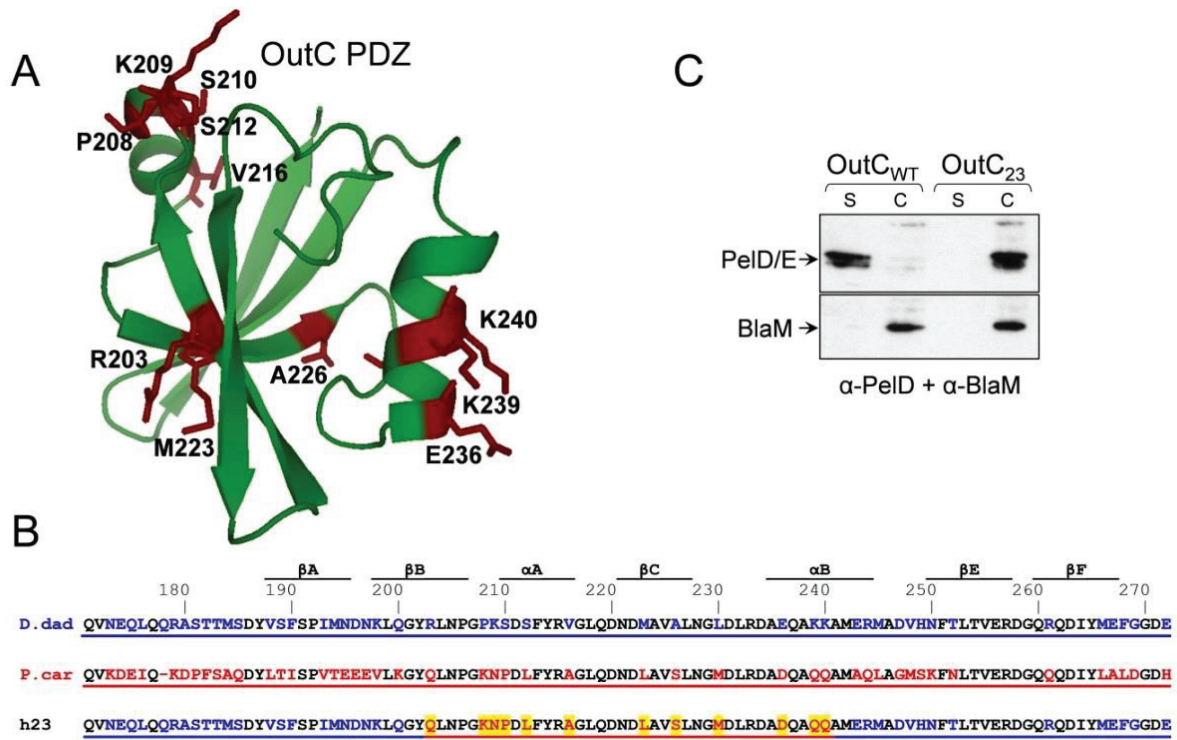


Figure 18. Représentation et fonctionnalité du domaine PDZ d'OutC-h23.

A) Structure du domaine PDZ d'OutC. Les résidus échangés avec ceux de *P. carotovorum* sont indiqués en rouge. B) Alignement des séquences des domaines PDZ de *D. dadantii* (en bleu) et *P. carotovorum* (en rouge). Les résidus substitués dans OutC-H23 sont indiqués en jaune. C) La fonctionnalité du domaine PDZ sauvage et PDZ-h23 a été analysée chez *D. dadantii* $\Delta outC$. Les cellules ont été transformées avec plasmide pTdB-oCDS portant *outC* sauvage ou *outC*-h23. Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que dans la Figure 15, les cellules ont été analysées avec des anticorps dirigés contre PelD et BlaM.

Nous avons effectué en parallèle le pontage dirigé du variant PelI D58pBpa co-exprimé avec OutC sauvage ou avec OutC-h23 (Figure 19). Le variant OutC-h23 a été produit au même niveau qu'OutC sauvage (Figure 19, comparer pistes 3 et 4). Cependant, le complexe entre PelI et OutC n'a été observé lorsque OutC sauvage a été co-exprimée (Figure 19, comparer pistes 2 et 3 avec 3 et 4). Ces résultats indiquent donc que la boucle 3 du domaine Fn3 de PelI interagit directement avec le domaine PDZ d'OutC.

Par ailleurs, on peut aussi constater que le complexe PelI-OutD ne semble plus être formé en présence du domaine PDZ-h23 non-fonctionnel (Figure 17, triangle blanc). Comme la boucle 3 de PelI semble d'interagir avec le domaine PDZ d'OutC et avec OutD, ceci peut indiquer l'existence d'un crosstalk fonctionnel entre ces deux interactions.

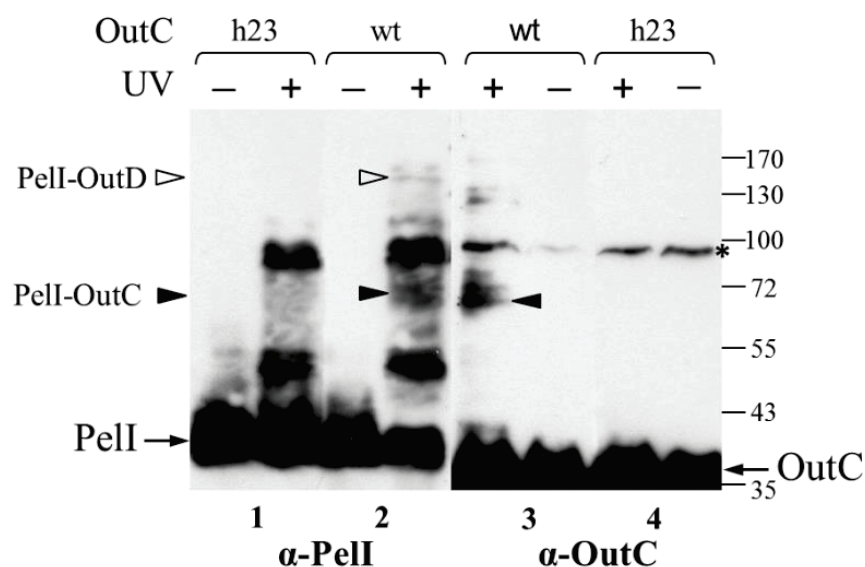


Figure 19. Pontage dirigé du variant PelI D58pBpa en présence du domaine PDZ sauvage ou PDZ-h23.

Le pontage dirigé avec le variant PelI D58pBpa a été réalisé chez *D. dadantii pelI ΔoutC* soit en présence d'OutC sauvage soit OutC-h23. Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que dans la Figure 15 et analysé avec les anticorps dirigés contre PelI et OutC. Le complexe PelI-OutC est indiqué avec un triangle noir, le complexe PelI-OutD, avec un triangle blanc. Les positions de protéines PelI et OutC sont indiquées avec les flèches, la bande non-spécifique, avec une étoile.

Par contre, nous avons observé que le complexe formé entre PelI D58pBpa et OutC n'est pas stable et se dégrade progressivement lors de quelques congélations-décongelations lors de dépôts du même échantillon sur le gel SDS-PAGE réalisés à des jours différents (Figure 20). Ainsi, la quantité du complexe PelI-OutC diminue avec chaque dépôt (Figure 20, triangle noir), contrairement à la quantité du complexe PelI-OutD qui reste relativement stable (Figure 20, triangle blanc).

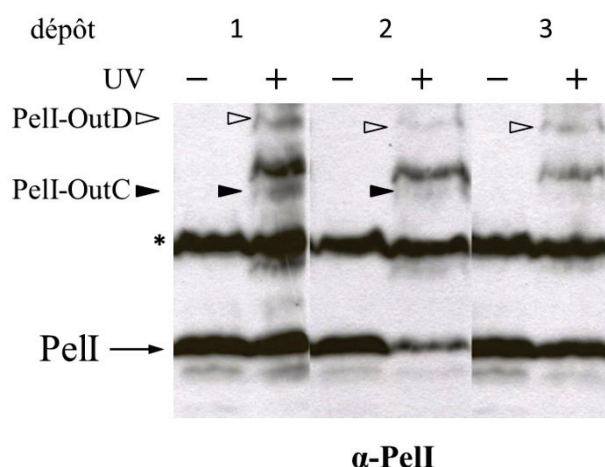


Figure 20. Instabilité du complexe PelI D58pBpa-OutC.

Le même échantillon issu du pontage dirigé de PelI D58pBpa présenté sur la Figure 15 a été déposé sur le gel SDS-PAGE trois jours différents à la suite. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles

noirs (PelI-OutC) ou blancs (PelI-OutD). La position de PelI est indiquée avec une flèche, la bande non-spécifique, avec une étoile.

III.1.1.d. Analyse de complexes par spectrométrie de masse.

L'analyse des complexes formés par le variant PelI D58pBpa par immunodétection m'a permis de mettre en évidence l'interaction de cette zone de PelI avec OutC et la sécrétine OutD (Figure 16). Les résultats présentés ci-dessus ont démontré que l'interaction entre PelI et OutC se passerait par l'interaction de la boucle 3 du Fn3 avec le domaine PDZ. Par contre, la détermination de la nature exacte du complexe PelI-OutD et de certains autres complexes formés par PelI D58pBpa a nécessité d'utiliser la spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse est une technique très sensible et pourrait donc permettre d'identifier les autres partenaires de PelI et, éventuellement, la région d'OutD impliquée dans la formation du complexe avec PelI. Puisque de tels complexes sont formés au sein d'un système de sécrétion fonctionnel et ne sont donc pas abondants, une étape d'enrichissement était indispensable. De plus, la spectrométrie de masse est une technique sensible aux contaminations. Nous avons donc décidé d'utiliser la technique de l'immunoprécipitation pour obtenir les échantillons d'une qualité compatible avec la spectrométrie de masse.

Pour générer plus de complexe d'intérêt, le variant PelI D58pBpa a été produit à partir du plasmide pTdB-PLI_{D58TAG}-oCDS dans la souche de *D. dadantii kdgK* A576. Une mutation dans *kdgK* portée par cette souche permet une plus forte induction du système Out en présence de galacturonate. Par ailleurs, pour augmenter la quantité du matériel, le pontage a été réalisé dans un volume plus important de la culture, 120 mL. Après une exposition aux UV, les cellules ont été cassées par sonication et séparées par ultracentrifugation afin d'isoler la fraction membranaire de la fraction soluble. En effet, comme les composants du T2SS sont ancrés dans une des membranes, on pourrait s'attendre à ce que les complexes seront membranaires. Ces fractions ont été ensuite analysées par l'immunodétection avec les anticorps contre PelI et par la coloration au Bleu de Coomassie pour choisir la fraction qui contient plus du complexe spécifique et moins de protéines contaminantes (Figure 21).

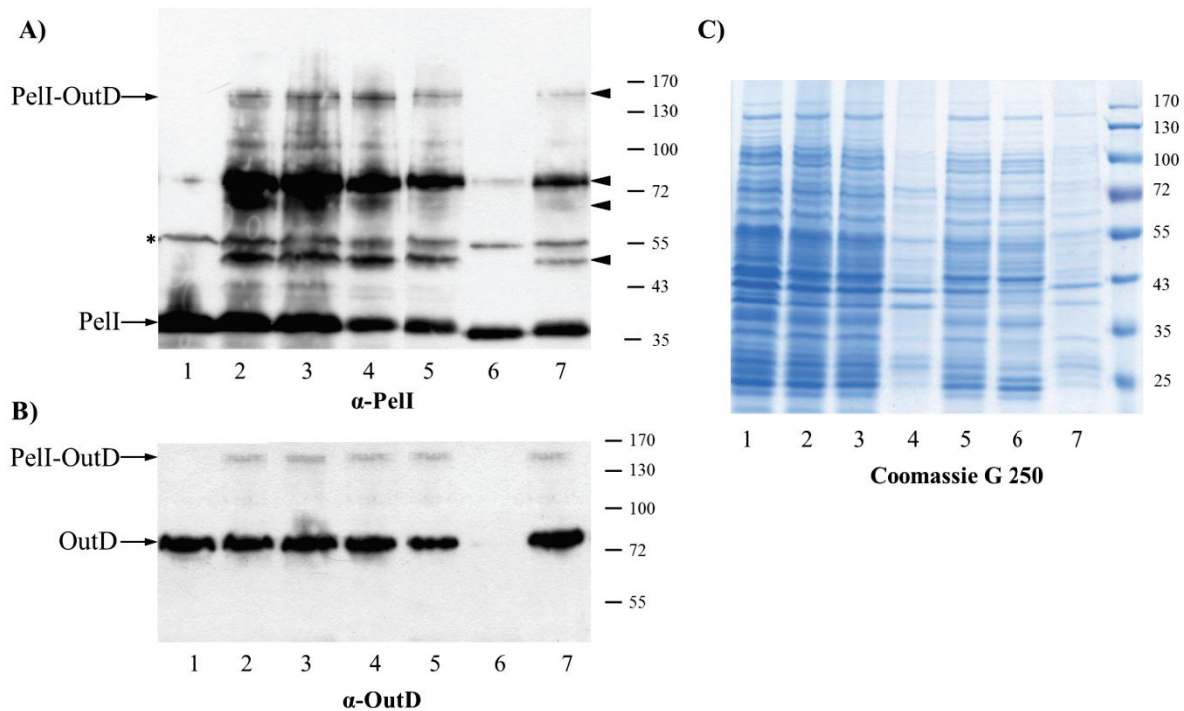


Figure 21. Détection de complexes formés par PelI D58pBpa dans les fractions cellulaires de *D. dadantii kdgK A576*.

Les cellules de *D. dadantii kdgK A576* portant plasmides pSup-BpaRS-6TRN et pTdB-PLI_{D58TAG}-oCDS ont été cultivées dans les mêmes conditions que celles dans la Figure 13 mais dans un volume de 120 mL (piste 1). Après le pontage (piste 2), les cellules ont été centrifugées, lavées et repris dans le tampon TBSE (piste 3), puis, cassées par sonication et centrifugées à 16 000 g pendant 5 min pour éliminer de débris cellulaires (piste 4). Le surnageant (piste 5) a été centrifugé à 40 000 g pendant 2 heures pour séparer la fraction soluble (piste 6) de la fraction membranaire (piste 7). La quantité de matériel dans chaque piste est équivalente à une DO600 de 3,2. L'immunodétection a été réalisée avec les anticorps contre PelI (A) et OutD (B). Les complexes formés par PelI D58pBpa sont indiqués par les triangles. C) Analyse des fractions cellulaires par la coloration au Bleu de Coomassie.

D'après ces résultats, pour réaliser l'immunoprécipitation de complexes formés par PelI D58pBpa, j'ai choisi la fraction de « débris cellulaires » et la fraction membranaire (Figure 21, pistes 4 et 7). L'immunoprécipitation a été réalisée en utilisant les anticorps contre PelI qui ont été fixés de façon non-covalente sur la résine de Protein A Sepharose CL-4B. Pour l'élution finale de protéines d'intérêt de la résine, plusieurs conditions ont été testées, notamment des solutions contenant de détergents et/ou de l'urée afin de décrocher efficacement le complexe PelI-OutD. Ensuite, les échantillons ont été séparés dans un gel SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie (Figures 22A et 23) et analysés en parallèle par immunodétection avec les anticorps contre PelI et OutD (Figure 22B et C). Ensuite, les bandes d'intérêt ont été découpées du gel coloré au Coomassie et envoyées à l'analyse par spectrométrie de masse. Les résultats d'une de ces expériences de pontage et d'immunoprécipitation sont présentés sur la Figure 22.

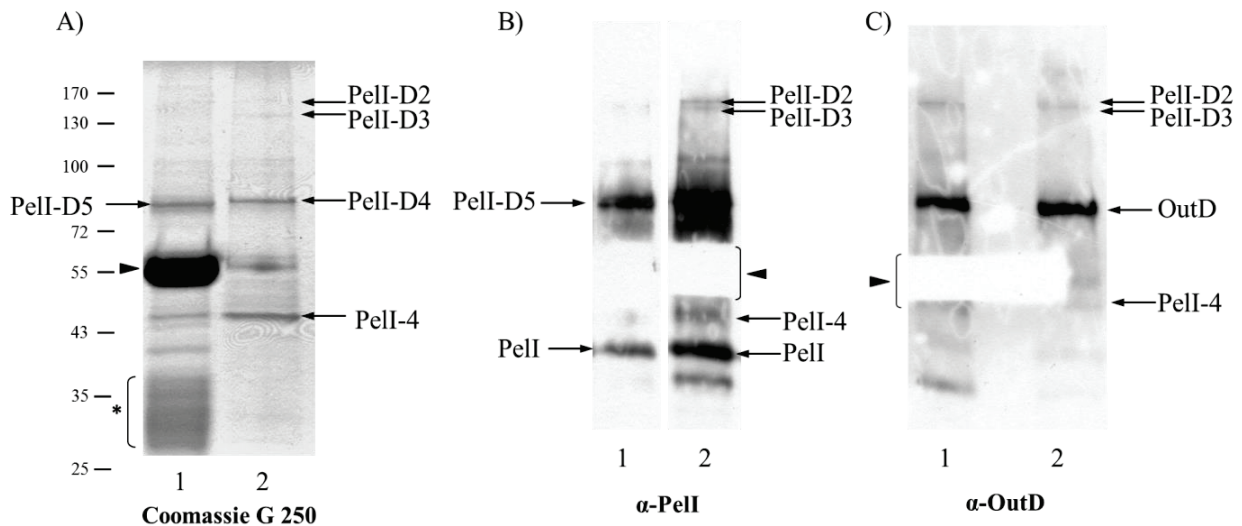


Figure 22. Immunoprécipitation de complexes formés par Peli D58pBpa.

Les cellules de *D. dadantii kdgK* A576 portant les plasmides pSup-BpaRS-6TRN et pTdB-PLI_{D58TAG}-oCDS ont été cultivées, exposées aux UV, cassées et séparées par ultracentrifugation comme dans la Figure 21. Pour l'immunoprécipitation, la fraction membranaire ainsi isolée a été solubilisée avec de NP-40 1% dans le TBSE et les complexes formés par le Peli D58pBpa ont été immunoprécipités avec les anticorps contre Peli fixés sur la résine de Protein A Sepharose CL-4B. Les protéines fixées sur la résine ont ensuite été éluées par une solution de 40 mM Tris HCl pH 6.8, 5 % de β-mercaptoéthanol, 0,8 % de SDS, 5 % de glycérol (piste 1) ou par une solution de 50 mM Tris HCl pH 8.0, 0,2% de SDS et 0,2% de NP-40 (piste 2) et puis, séparées dans un gel de SDS-PAGE 9 % et soit colorées au bleu de Coomassie (A) soit révélées par immunodétection avec les anticorps dirigé contre Peli (B) et OutD (C). Les bandes indiquées indiquées avec les flèches ont ensuite été découpées du gel et analysées par spectrométrie de masse (voir le Tableau 1). Lors de l'immunodétection (panels B et C), afin d'éviter une fixation massive des anticorps secondaires sur les chaînes lourdes des anticorps dirigés contre Peli (une bande très intense de 55 kDa sur la piste 1 de panel A), une partie correspondante de la membrane a été découpée (la position est indiquées avec un triangle noir).

La coloration du gel au bleu de Coomassie (Figure 22A) et l'immunodétection (Figure 22B et C) ont permis de détecter deux complexes appelés Peli-D2 et Peli-D3 qui réagissent avec les anticorps dirigés contre Peli (Figure 22B) et OutD (Figure 22C) et qui ont des poids moléculaires apparents compatibles avec un complexe Peli-OutD, respectivement de 140 kDa et 130 kDa. L'analyse par spectrométrie de masse a permis de détecter la présence de deux protéines, Peli et OutD, dans le complexe Peli-D2. Dans le complexe Peli-D3, plusieurs peptides correspondant à la protéine OutD ont été détectées, mais pas ceux de Peli. Ceci pourrait être expliqué par la dégradation du complexe initial formé entre Peli et OutD. Afin d'augmenter la quantité du complexe Peli-D2 dans l'éluat final, j'ai réalisé ce type d'expériences cinq fois, souvent en modifiant les conditions de fractionnement, d'immunoprécipitation et d'éluat. Cependant, malheureusement, la quantité de peptides détectés et le pourcentage de recouvrement n'a pas permis d'identifier la région précise d'OutD qui interagit avec Peli D58pBpa (voir Annexe I, p.186-193). En effet, les complexes formés ont tendance à se dégrader au cours du

fractionnement et de l'immunoprécipitation. Ainsi, les peptides correspondants à la région périplasmique d'OutD ont été parfois retrouvés dans les bandes de petite taille, par exemple, dans le complexe PelI 4 (Figure 22, Tableau 1).

Ainsi, quelques séries de pontages UV ont été réalisées et traitées d'une manière similaire à celle présentée sur la Figure 22. Cependant, pour améliorer la qualité et la richesse de l'éluat final, certaines conditions ont été modifiées tout au long de ces expériences, notamment la façon de préparer les échantillons (la solubilisation avec différents détergents, conditions du fractionnement etc), de procéder l'immunoprécipitation (le temps d'incubation, la quantité des anticorps et de la résine, la façon de fixer les anticorps sur la résine). Enfin, plusieurs tampons contenant différents détergents et/ou de l'urée ont été utilisés pour permettre une élution sélective et efficace des complexes (Figure 23). Par ailleurs, afin d'améliorer la solubilité des complexes formés par la sécrétine OutD, j'ai aussi testé le traitement des éluats au phénol et leur séparation sur un gel avec urée (résultats non montrés). Plusieurs complexes (une vingtaine au total) issus de ces expériences, y compris des complexes de petite taille et des complexes d'environ 70-80 kDa ont été envoyés à l'analyse par spectrométrie de masse. Certains de ces résultats sont présentés dans le Tableau I et discutés ci-dessous.

Les deux bandes, d'une taille d'environ 80 kDa, PelI-D4 et PelI-D5, sont très proches sur le gel (Figure 22), mais la nature de ces complexes ne semble pas être la même. En effet, l'analyse par spectrométrie de masse a démontré que la bande PelI-D4 contient majoritairement des peptides d'OutD avec un recouvrement allant de 62% à 80% de la séquence d'OutD. Le poids moléculaire apparent de PelI-D4 correspond au monomère d'OutD (Figure 22A et C). Ces résultats suggèrent donc que la sécrétine OutD non-crosslinkée serait massivement co-immunoprécipitée avec PelI pour constituer la fraction PelI-D4. Ceci est bien compatible avec une interaction supposée entre la sécrétine et les protéines à sécréter, mais ce phénomène ne nous permet pas de déterminer la nature d'une telle interaction non covalente. Au contraire, la nature exacte de la bande encore plus abondante, PelI-D5, reste à préciser. Vu les résultats de spectrométrie de masse, il pourrait s'agir soit d'un complexe de PelI avec OmpA, soit d'un homodimère de PelI, soit des deux. En effet, les positions de ces deux complexes présumés sont très proches entre elles et de celle d'OutD (PelI-D4).

Comme on peut voir dans le Tableau 1, le poids moléculaire apparent et la composition du complexe PelI-D5 serait très proche de ceux de PelI-10, PelI-11, PelI-12 et PelI-13 issus de différentes séries d'expériences. Ils semblent correspondre au même type de complexe qui contient les peptides de PelI et OmpA. OmpA est une protéine assez majoritaire qui est localisée

dans la membrane externe et possède un domaine de liaison au peptidoglycane. PelI pourrait éventuellement se retrouver proche de cette protéine pendant l'étape périplasmique du recrutement par le T2SS. Une implication du peptidoglycane dans cette étape périplasmique de PelI serait aussi envisageable. En effet, lors de traitements d'échantillons issus de pontage-UV, j'ai aussi testé leur digestion par le lysozyme. Même si j'ai constaté un certain éclaircissement des profils, le traitement au lysozyme n'a pas provoqué la disparition d'un complexe donné (résultats non montrés).

La présence de peptides correspondant au chaperon général GroEL a été détectée dans les bandes PelI-10 et PelI-13. GroEL est un chaperon cytoplasmique qui interagit avec les séquences hydrophobes des protéines étant sous une forme dépliée. Il n'est pas donc exclu que GroEL puisse interagir dans le cytoplasme avec la protéine PelI portant le *pBpa*.

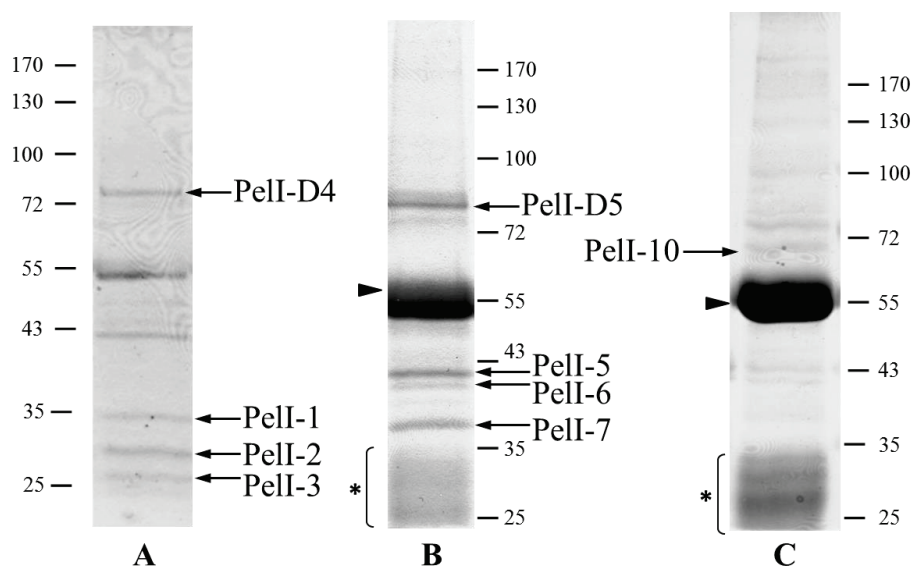


Figure 23. Résultats de différents tests d'immunoprécipitation de complexes formés par PelI D58pBpa.

Différentes séries de pontages-UV ont été réalisées et traitées d'une manière similaire à celle sur la Figure 21. Cependant, selon la nature des fractions utilisées pour l'immunoprécipitation et la composition de la solution d'élution, les profils des complexes ainsi élués varient. A) élution avec 50 mM Tris HCl pH 8.0, 0,2% de SDS et 0,2% de NP-40, B) élution avec 40 mM Tris HCl pH 6.8, 5 % de β -mercaptoéthanol, 0,8 % de SDS, 5 % de glycérol, C) élution avec la solution de l'urée 6M. La position de chaînes lourdes des anticorps dirigés contre PelI est indiquées avec un triangle noir, celle de chaînes légères, avec une étiquette. Les bandes indiquées indiquées avec les flèches ont ensuite été découpées du gel et analysées par spectrométrie de masse (voir le Tableau 1).

Il faut aussi mentionner que suite aux procédures d'immunoprécipitation et d'élution, nous n'avons pas pu détecter une bande correspondante au complexe PelI-OutC ni par coloration du gel au bleu de Coomassie (Figure 23A) ni par immunodétection (non présentée). Néanmoins,

l'analyse par spectrométrie de masse a permis de détecter la présence de peptides correspondants à la protéine OutC dans la bande de PelI-1 (~40 kDa) (Figure 23A, Tableau 1). Il pourrait s'agir d'une petite fraction d'OutC « libre » co-immunoprécipitée avec PelI ou des produits de dégradation d'un complexe PelI-OutC. En effet, comme j'ai déjà indiqué, le complexe PelID58*p*Bpa-OutC n'est pas stable et se dégrade progressivement même lors de quelques congélations-décongélations et de dépôts successifs du même échantillon sur des gels de SDS-PAGE réalisés à des jours différents (Figure 20).

En conclusion, l'analyse de complexes formés par PelI D58*p*Bpa par spectrométrie de masse a permis de confirmer l'interaction directe entre la boucle 3 de PelI et la sécrétine OutD. Cependant, la région exacte d'OutD reste à déterminer. La nature exacte de deux complexes abondants formés par PelI D58*p*Bpa (de 80kDa et 50kDa) reste à déterminer. On peut donc supposer que de PelI est impliquée dans l'interaction avec plusieurs protéines via sa boucle 3, ces interactions sont indiquées de la façon schématique sur la Figure 24.

Figure 24. Représentation schématique des interactions de PelI D58pBpa

Tableau 1. Résultats d'analyse par LC/MS/MS :

Bande	Protéine	Masse/kDa	Peptides	Recouvrement/%
PelI-D1 ~140 kDa	PelI	36.7	12	21.8
	OutD	76.2	10	8.87
PelI-D2 ~140 kDa	PelI	36.7	4	13.66
	OutD	76.2	33	34.23
PelI-D3 ~130 kDa	OutD	76.2	32	32.39
PelI-D4 ~80 kDa	OutD	76.2	470	61.83
	PelI	36.7	22	28.20
	OmpA	37.6	16	28.33
	FtsH	70.8	51	49.92
PelI-D5 ~80 kDa	PelI	36.7	6	20.64
	OmpA	37.6	13	38.24
	OutD	76.2	3	7.61
PelI-1 ~40 kDa	OutD	76.2	5	14.23
	OutC	30.1	5	13.97
PelI-3 ~28 kDa	OutD	76.2	3	6.76
PelI 4 ~45 kDa	OutD	76.2	2	3.52
	PelI	36.7	3	6.83
PelI-10 ~70 kDa	PelI	36.7	13	55.5
	OmpA	37.6	15	55.2
	GroEL	57.4	52	80.8
PelI-11 ~80 kDa	PelI	36.7	21	35.76
	OmpA	37.6	28	34.84
PelI-12 ~75 kDa	PelI	36.7	18	30.52
	OmpA	37.6	24	26.35
PelI-13 ~70 kDa	PelI	36.7	7	12.79
	OmpA	37.6	4	14.16
	GroEL	57.4	24	27.37

III.1.2. Pontage dirigé *in vivo* des autres régions non-structurées de Pell.

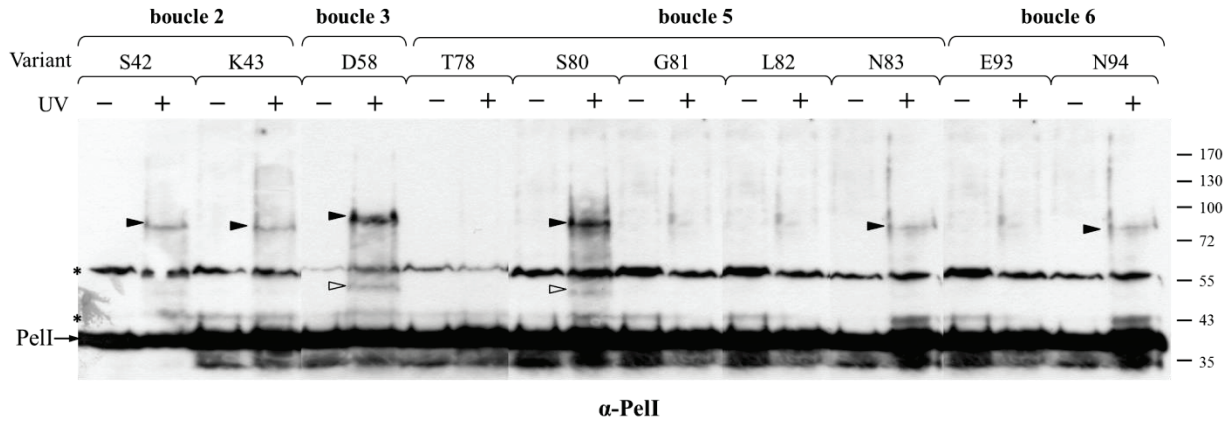
Des travaux récents réalisés au laboratoire suggèrent que le domaine Fn3, qui est moins conservé entre les pectate lyases homologues Pell et Pel3, porte la majorité de l'information indispensable pour la sécrétion de Pell (Pineau *et al.*, 2014). Nous avons mis en évidence que la boucle 3 de Fn3 constitue ou fait partie d'un motif de sécrétion et qu'elle interagit directement avec les deux composants du système, OutC et OutD. Cependant, la faible quantité de complexes formés lors du pontage-UV chez *D. dadantii* et leur instabilité (surtout du complexe entre Pell et OutC) n'ont pas permis de déterminer les zones exactes d'OutC et d'OutD impliquées dans l'interaction avec la boucle 3 de Fn3. Il est aussi possible que d'autres régions du domaine Fn3 puissent également participer à la reconnaissance et recrutement de Pell. Ainsi, on peut raisonnablement s'attendre à ce que l'incorporation du *pBpa* dans certaines autres régions de Pell permet la formation des complexes avec les composants du T2SS.

Dans cette nouvelle recherche de signaux de sécrétion potentiels, nous avons, tout d'abord, exploité les régions du domaine Fn3 moins conservées entre Pell et Pel3. Nous avons donc choisi quelques résidus situés sur les boucles et bien exposés à la surface : la boucle 2 (S42 et K43), la boucle 5 (T78, S80, G81, L82 et N83) et la boucle 6 (E93 et N94) (Figures 11 et 25).

Pour tester les positions sélectionnées dans les conditions du T2SS fonctionnel, les variants du gène *pell*_{TAG} ont été exprimés dans une souche de *D. dadantii kdgK* A576 car la mutation *kdgK* permet une plus forte induction du système Out. Le variant Pell D58*pBpa* a été utilisé comme control positif (Figure 25).

Ces résultats montrent que certains variants de Pell portant le *pBpa* génèrent des complexes d'une taille d'environ 80 kDa, similaires au complexe majoritaire formé par Pell D58*pBpa* (Figure 25). Ce type de complexes a été observé avec les substitutions de S42 et K43 (boucle 2), G81 et N83 (boucle 5) et N94 (boucle 6). Il est donc bien possible qu'ils soient formés grâce à l'interaction de Pell avec le même partenaire. En effet, selon les endroits exacts de pontage, les complexes formés par les mêmes protéines peuvent avoir des formes différentes, par exemple, de type « X », « Y » ou « V », et ils migrent donc un peu différemment sur le gel SDS PAGE (voir aussi l'explication sur la Figure 2 de Wang *et al.*, 2012, p.253). L'analyse de ces complexes avec les anticorps dirigés contre certains composants (OutC, OutK, OutL) n'a pas donné une réponse positive (non montré).

A)



B)

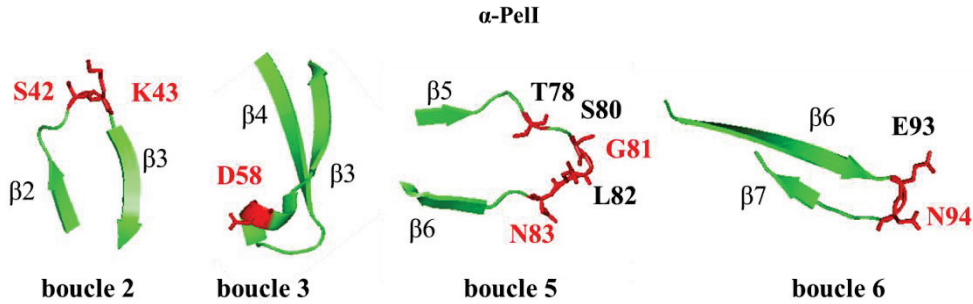


Figure 25. Pontage dirigé des régions non-structurées du domaine Fn3 de PelI chez *D. dadantii* *kdgK*.

(A) Les cellules de *D. dadantii* *kdgK* A576 ont été transformées avec pSup-BpaRS-6TRN pBS-PLI_{TAG}. Le résidu de PelI substitué dans ce dernier plasmide est indiqué en haut. Les cultures ont été réalisées pendant 8 heures dans les mêmes conditions que celles indiquées dans Figure 15 et analysées de la même manière par immunodétection avec des anticorps dirigés contre PelI. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles et les bandes non-spécifiques, avec les étoiles. (B) Les résidus substitués sont présentés en rouge sur les parties correspondantes de la structure.

Nous nous sommes intéressés aux conditions de formation de tels complexes. Ainsi, si ces complexes sont générés lors du processus de sécrétion, ils ne seront plus formés dans une souche non-sécrétrice de *D. dadantii*. Afin de vérifier cette hypothèse, les variants de PelI mentionnés ci-dessus ont été exprimés dans une souche de *D. dadantii* $\Delta outC$. Pour comparer les deux conditions en parallèle (sécrétion + ou -), la mutation d'*OutC* a été complétée ou non avec une version d'*outC* plasmidique, respectivement le plasmide pTdB-PLI_{TAG}-oCDS et pTdB-PLI_{TAG}. Cependant, à l'exception du variant PelI D58pBpa, les profils de pontage UV observés dans les deux cas ont été similaires (résultats non montrés). Il est donc peu probable que la formation de complexes observés soit liée directement au fonctionnement du T2SS. Pourtant, on ne peut pas complètement exclure qu'une protéine non identifiée puisse jouer le rôle d'un chaperon et interagir avec les substrats du T2SS avant leur recrutement par la machinerie. Dans ce cas là, l'interaction serait conservée même en absence d'*OutC* et de la machinerie fonctionnelle.

Cependant, vu que les complexes formés par les variants de PelI S42, K43, G81, N83 et N94 sont encore moins abondants que ceux de D58 (Figure 25), nous n'avons pas entamé des essais de leur production massive et co-immunoprécipitation en vue d'une analyse par spectrométrie de masse. Effectivement, vu les difficultés rencontrées lors de l'analyse du complexe de cette taille formé par PelI D58pBpa, pourtant beaucoup plus abondant, nous n'avons pas considéré cet axe comme prioritaire. Bien que la nature de ces complexes reste à déterminer, ces résultats suggèrent que les régions non-structurées du domaine Fn3 de PelI soient impliquées dans l'interaction avec un partenaire non identifié avant le recrutement de PelI par le système Out. Par ailleurs, même si les résidus ainsi substitués (Figure 25) ne recouvrent pas complètement toutes les zones non-structurées de Fn3, il semble que l'interaction de Fn3 avec OutC et OutD ne soit pas si fréquente et serait limitée à la boucle 3.

III.1.3. Pontage dirigé *in vivo* de brins- β du domaine Fn3 de Pell.

Des résultats récemment obtenus au laboratoire par double hybride bactérien et résonance de plasmons de surface ont démontré que le domaine Fn3 de PelI interagit avec le domaine N1 de la sécrétine OutD (Pineau *et al.*, 2014). La même interaction a été également détectée avec le domaine Fn3 de Pel3 (l'homologue de PelI chez *P. carotovorum*). Ces résultats peuvent suggérer que certaines zones conservées entre PelI et Pel3 soient impliquées dans l'interaction avec le domaine N1 d'OutD. Puisque les brins β sont les zones les plus conservées entre les deux pectate lyases, nous avons considéré une implication possible de tels éléments structuraux dans l'interaction entre Fn3 et OutD. Cette hypothèse semble d'autant plus probable que les protéines sécrétées par le T2SS sont généralement riches en brins β et leur implication dans la reconnaissance des substrats a été suggérée auparavant (voir aussi le Chapitre VIII.5.2, p. 113.

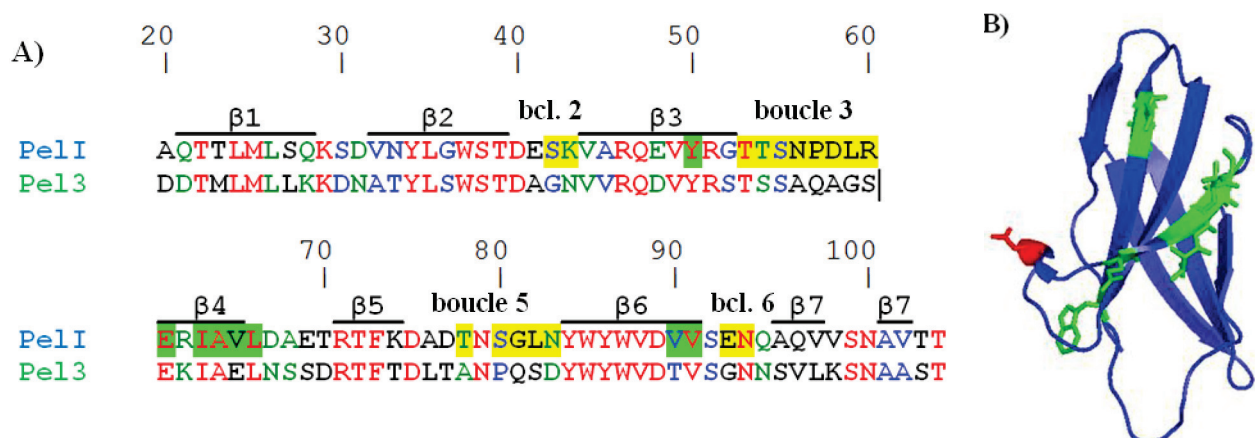


Figure 26. Résidus situés dans les brins β du domaine Fn3 de Pell sélectionnés pour l'incorporation du *p*Bpa.

A) Alignement de séquences des domaines Fn3 des pectate lyases PelI et Pel3. Les résidus à substituer

sélectionnés dans les régions structurées de Fn3 sont représentés en vert. B) Structure du domaine Fn3 de Pell avec les résidus sélectionnés présentés en vert. D58 situé dans la boucle 3 est présenté en rouge.

Les variants de Pell portant les substitutions du *pBpa* à la place de résidus sélectionnés ont été analysés par le pontage dirigé *in vivo* dans la souche de *D. dadantii* *kdgK* A576 (Figure 27).

Le variant Pell E61*pBpa* a généré deux complexes, similaires à ceux formés par Pell D58*pBpa* : un complexe d'une taille d'environ 80 kDa et un autre d'environ 50 kDa (Figure 27). De plus, un complexe d'une taille d'environ 55 kDa a été observé avec le variant Pell L66*pBpa*. L'analyse de ces complexes avec les anticorps dirigés contre certains composants (OutC, OutK, OutL) n'a pas donné une réponse positive.

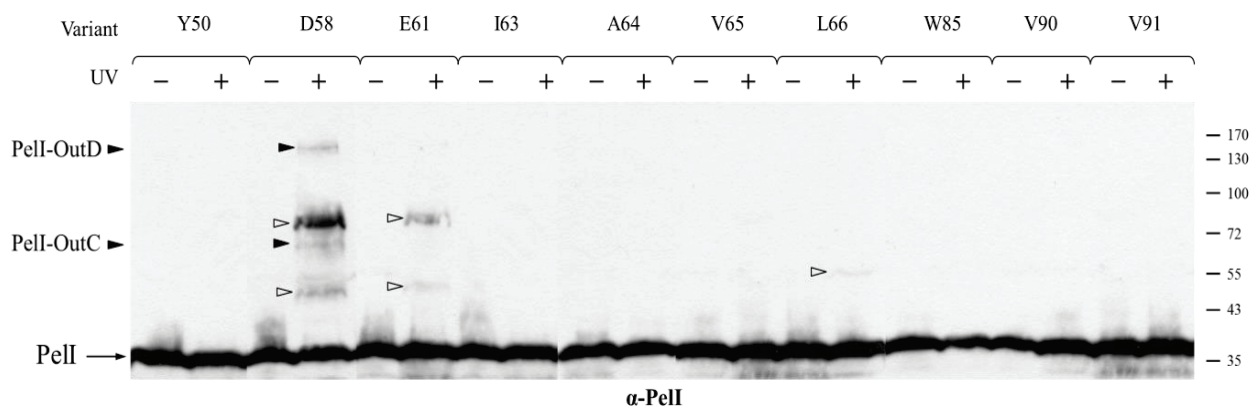


Figure 27. Pontage dirigé de brins- β du domaine Fn3 de Pell chez *D. dadantii*.

Les cellules de *D. dadantii* *kdgK* A576 ont été transformées avec les plasmides pSup-BpaRS-6TRN et pTdB-PLI_{TAG}-oCDS. Le résidu de Pell substitué dans ce dernier plasmide est indiqué en haut. Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles indiquées dans Figure 15. Les cellules ont été ensuite prélevées et exposées aux UV pendant 3 min (+) ou non (-) et analysées par immunodétection avec les anticorps dirigés contre Pell. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles.

Il faut aussi remarquer qu'aucun complexe d'un haut poids moléculaire, compatible avec la sécrétine OutD n'a été détecté. Ces résultats ne semblent pas être cohérents avec les analyses réalisées récemment au laboratoire par le pontage disulfure (Pineau *et al.*, 2014). Cette dernière étude a suggéré que la proximité entre le brin β 4 de Fn3 et le brin β 6 du domaine N1 d'OutD serait adéquate à la formation d'un pont disulfure. Cependant, le pontage dirigé *in vivo* nécessite une proximité plus importante entre les partenaires (d'environ 4 Å), contre une distance de 6 à 8 Å, dans le cas de pontage disulfure. Par ailleurs, il ne peut pas être complètement exclu que l'incorporation du *pBpa* affecte cette interface présumée.

II.2. Pontage dirigé *in vivo* du linker entre les deux domaines de PelI.

Les deux domaines de PelI sont connectés par un linker flexible de 18 résidus. Cette région n'est pas visible sur la structure tridimensionnelle de PelI. Par contre, dans la structure de Pel3 résolue récemment au laboratoire, ce linker occupe un grand espace et se situe en partie à côté de la boucle 3 du domaine Fn3 en formant une espèce de poche entre ces deux éléments structuraux (Figure 28). Or, comme nous l'avons démontré ci-dessus, la boucle 3 de Fn3 est impliquée dans la reconnaissance de PelI et interagit directement avec OutC et OutD. Il n'est donc pas exclu que ces deux régions, le linker entre les deux domaines et la boucle 3, agissent ensemble. De plus, la partie N-terminale du linker, impliquée dans la formation de cette poche avec la boucle 3 de Fn3 n'est pas conservée, elle est constituée de cinq résidus (APNAG) dans PelI contre seulement trois (APA), dans Pel3 (Figure 28A, la zone en rose). Ces cinq résidus situés au début du linker de PelI ont donc été remplacés par le *pBpa* : A106, P107, N108, A109, G110 (Figure 28A).

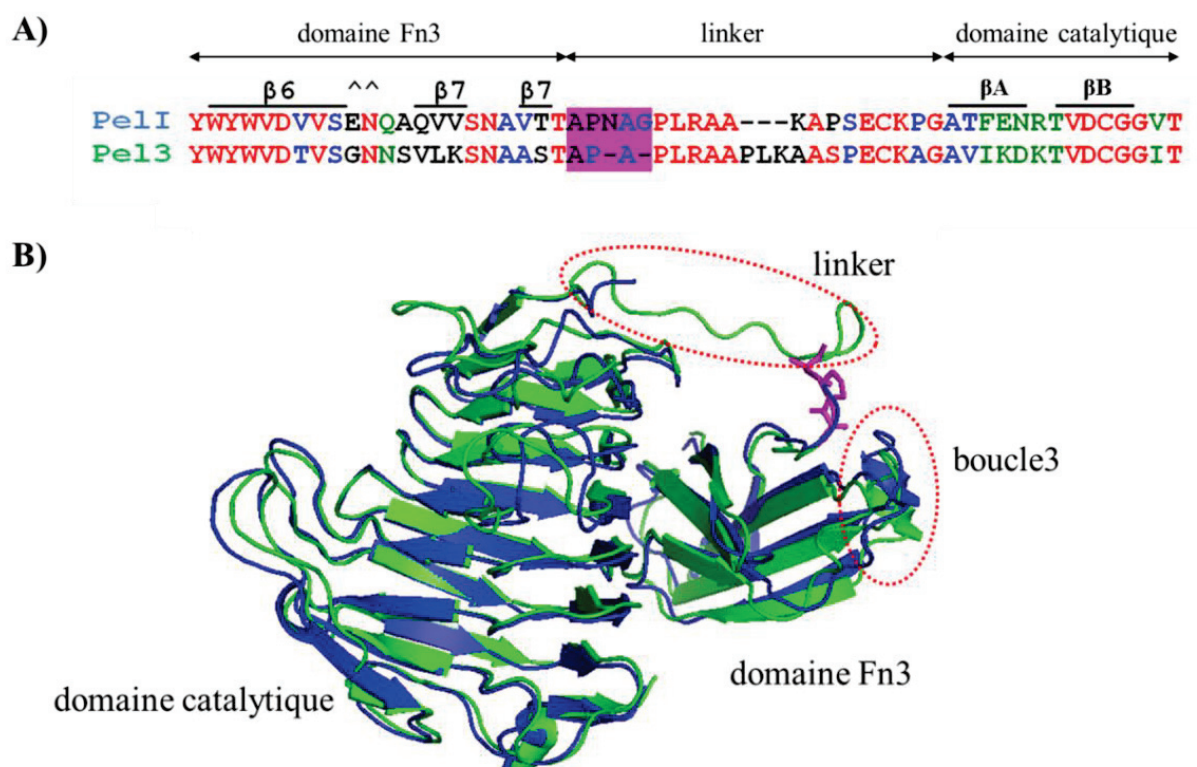


Figure 28. Positions dans le linker entre les domaines Fn3 et catalytique de PelI sélectionnées pour l'incorporation du *pBpa*.

A) Alignement des séquences des pectate lyases PelI et Pel3. Les résidus sélectionnés pour l'incorporation de *pBpa* sont représentés en rose. B) Superposition des structures de PelI (en bleu) et Pel3 (en vert). Le linker entre les deux domaines n'est visible que dans la structure de Pel3. Les résidus sélectionnés pour l'incorporation de *pBpa* sont présentés en rose.

Tout d'abord, la sécrétion de variants PelI portant le *pBpa* à la place de l'un de ces résidus a été analysée chez *D. dadantii* (Figure 29). On peut constater que la sécrétion de variants PelI A106*pBpa*, PelI P107*pBpa* et PelI G110*pBpa* est fortement affectée voir complètement arrêtée (Figure 29 ; comparer les pistes 2, 3 et 6 par rapport à 1). Par contre, les variants PelI N108*pBpa* et PelI A109*pBpa* restent partiellement sécrétés (Figure 29 ; pistes 4 et 5). Ce test suggère donc que cette région reliant les deux domaines de PelI n'est pas un simple linker mais elle est importante pour la reconnaissance de PelI par le système Out. Il est donc possible que cette region puisse interagir directement avec les composants du T2SS.

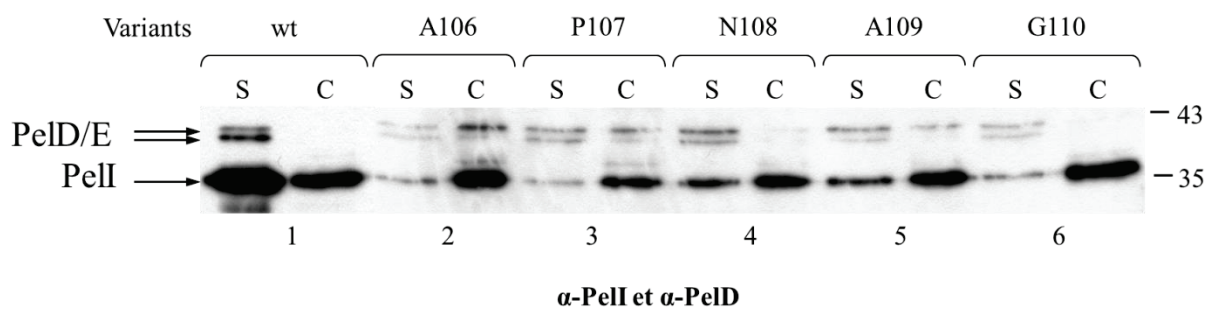


Figure 29. Test de sécrétion de variants PelI portant le *pBpa* dans le linker entre le domaine Fn3 et domaine catalytique.

Les cellules de *D. dadantii pelI* A3776 ont été transformées avec pSup-BpaRS-6TRN et pTdB-PLI_{TAG}-oCDS. Le résidu de PelI substitué dans ce dernier plasmide est indiqué en haut. Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles indiquées dans Figure 14 et analysées de la même manière par immunodétection avec des anticorps dirigés contre PelI et PelD. La quantité de protéines détectée dans le surnageant (S) indique l'efficacité de la sécrétion. Les positions des pectate lyases PelI, PelD et PelE sont indiquées avec les flèches (les anticorps dirigés contre PelD cross-réagissent avec PelE qui possèdent 62% d'identité avec PelD).

Le pontage dirigé réalisé chez *D. dadantii* a démontré que tous les cinq variants de PelI testés génèrent des complexes (Figure 30). La présence d'un complexe majoritaire d'une taille d'environ 80 kDa a été observée avec tous les variants même si la taille exacte de ces bandes varie (Figure 30).

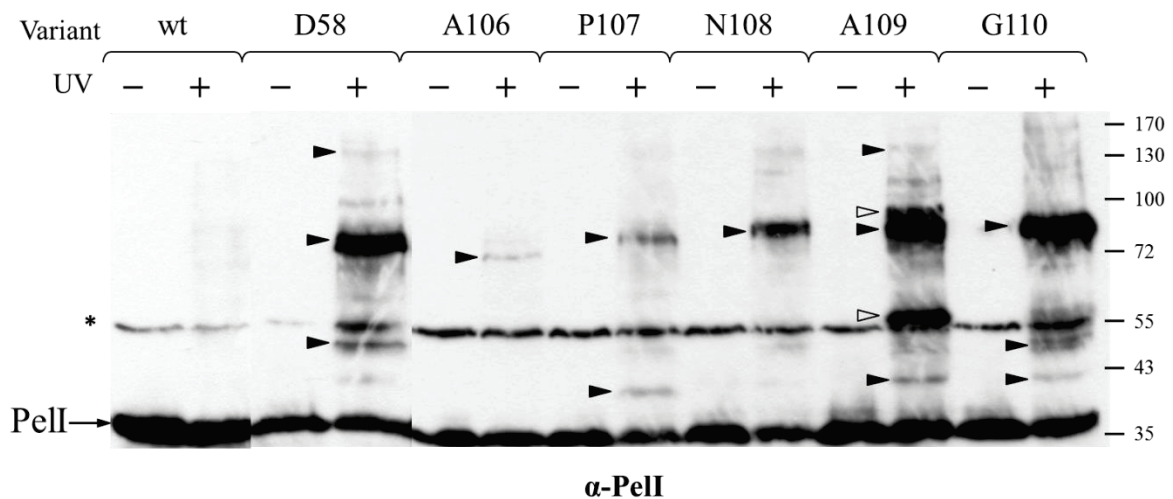


Figure 30. Pontage dirigé chez *D. dadantii pelI* du linker entre deux domaines de Pell.

Les cultures de *D. dadantii pelI* A3776 portant les mêmes plasmides que dans la figure 29 ont été réalisées dans les mêmes conditions. Les cellules ont été ensuite prélevées et exposées aux UV pendant 3 min (+) ou non (-) et analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre Pell. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles blancs et noirs, la bande non-spécifique, avec une étoile.

Dans le cas de Pell A106pBpa, le poids apparent de cette bande est très différent, il pourrait donc s'agir d'un complexe avec un autre partenaire que pour les variants de P107 à G110. Remarquablement, dans le cas de Pell A109pBpa plusieurs complexes abondants ont été observés en plus, notamment les deux très majoritaires, un d'environ 90 kDa et un autre d'environ 60 kDa (indiqués avec les triangles blancs). Ce type de complexes n'a pas été observé avec les deux variants adjacents, N108 et G110 indiquant que la proximité entre les partenaires nécessaire à la formation de ces deux complexes n'est atteinte que dans le cas de Pell A109pBpa. Il faut aussi indiquer que contrairement au Pell G110pBpa, le variant Pell A109pBpa est sécrété et donc les complexes qu'il génère peuvent refléter des interactions au cours de la sécrétion. Par ailleurs, dans la zone de 110 à 170kDa qui pourrait contenir des complexes d'OutD, plusieurs bandes ont été observées pour les variants de Pell portant le pBpa à la place de N108, A109 et G110 (Figure 30).

Nous nous sommes intéressés à la nature de ces complexes. Comme la taille de certains bandes observées avec Pell A106pBpa (~75 kDa) et Pell A109pBpa (~60 kDa) serait compatible avec un complexe entre Pell et OutC, ces échantillons ont été analysés avec des anticorps dirigés contre OutC (Figure 31A et B).

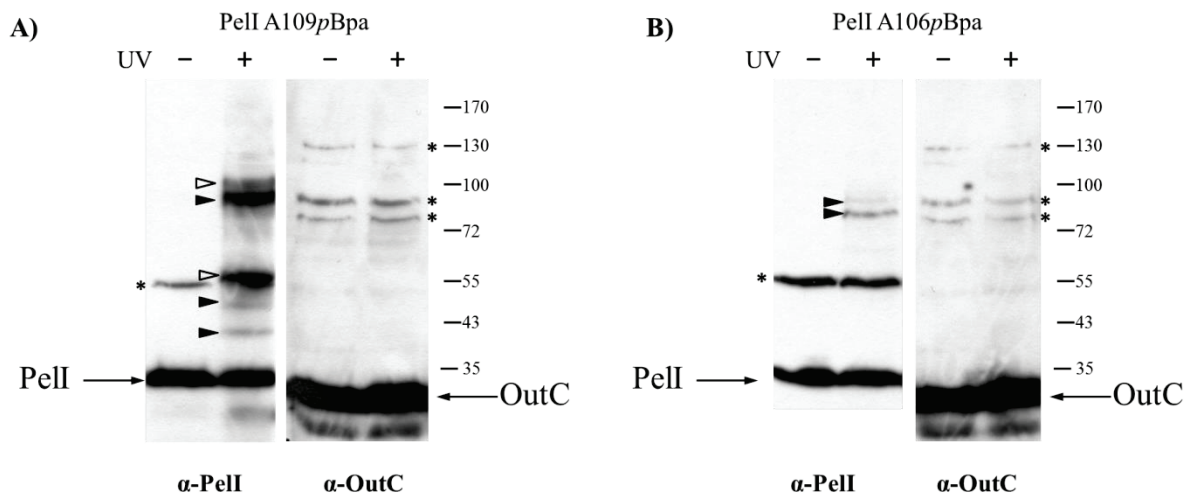


Figure 31. Pontage dirigé *in vivo* de variants PelI A106pBpa et PelI A109pBpa.

Les échantillons issus du pontage dirigé *in vivo* présentés sur la Figure 27 ont été analysés en parallèle avec des anticorps dirigés contre PelI et OutC. Les positions de PelI et OutC sont indiquées avec les flèches. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles, les bandes non spécifiques sont indiquées avec les étoiles.

Aucun complexe spécifique n'a été observé avec des anticorps dirigé contre OutC (Figure 31A et B). L'analyse des mêmes échantillons avec des anticorps dirigés contre certains autres composants du T2SS (OutG, OutL et OutM) n'a pas donné non plus une réponse positive (non montré). Ces résultats suggèrent donc que cette région du linker de PelI n'est pas impliquée dans l'interaction avec les composants OutC, OutG, OutL ou OutM et les complexes observés sont formés avec d'autres protéines.

Cependant, l'analyse de ces mêmes échantillons avec des anticorps dirigés contre OutD a démontrée que le complexe de 140 kDa serait formé grâce à l'interaction de PelI A109pBpa avec la sécrétine (Figure 32A). Afin de confirmer la nature spécifique de ce complexe, nous avons réalisé le pontage dirigé *in vivo* en parallèle, chez *E. coli* et *D. dadantii* (Figure 32B). On peut constater, que le complexe entre PelI A109pBpa et OutD n'est formé que chez *D. dadantii*. Ceci confirme un caractère fonctionnel de cette interaction qui ne se produit qu'au sein du système Out fonctionnel.

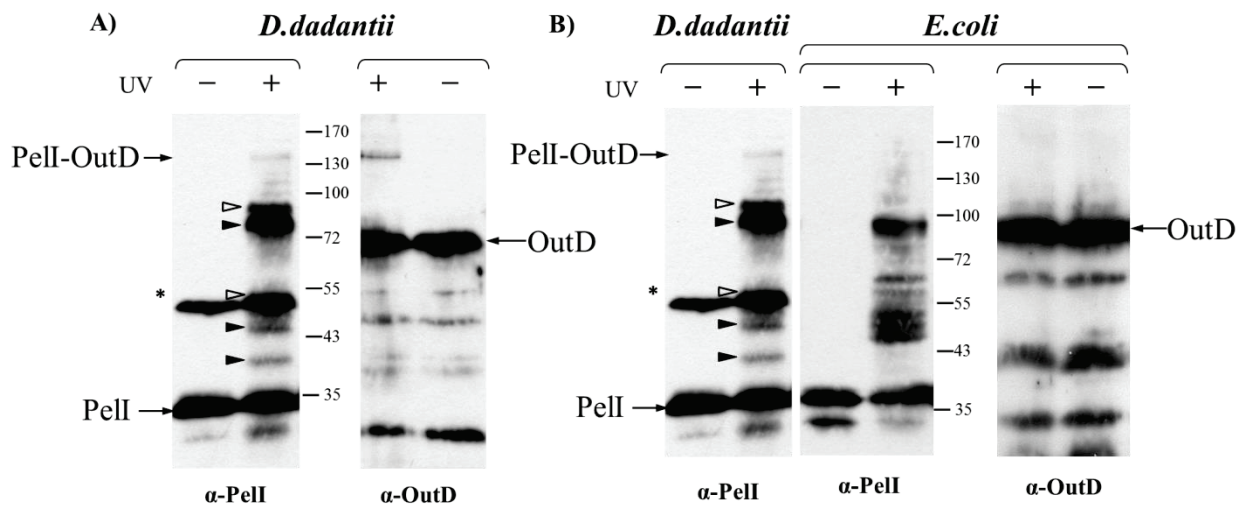


Figure 32. Pontage dirigé *in vivo* du variant PelI A109pBpa.

Les cultures de *D. dadantii pelI* A3776 et *E. coli* MC4100 portant les mêmes plasmides : pSup-BpaRS-6TRN et pTdB-PLI A109pBpa-oCDS ont été réalisées dans les mêmes conditions. Les cellules ont été ensuite prélevées et exposées aux UV pendant 3 min (+) ou non (-). (A) Les cellules de *D. dadantii* ont été analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre PelI et OutD (B) Les cellules de *D. dadantii* et *E. coli* ont été testées en parallèle. Les positions de protéines PelI et OutD et du complexe PelI-OutD sont indiquées avec les flèches et la bande non-spécifique, avec une étoile.

En conclusion, le pontage dirigé *in vivo* a permis de démontrer que le linker entre deux domaines de PelI n'est pas une simple liaison, il est directement impliqué dans l'interaction avec la sécrétine OutD chez *D. dadantii*. De plus, cette région est aussi impliquée dans l'interaction avec une ou plusieurs protéines, dont la nature reste à déterminer.

II.3. Pontage dirigé du domaine catalytique.

Nous avons démontré que le domaine Fn3 de PelI est impliqué dans l'interaction avec les composants du T2SS et avec certains autres partenaires d'une nature inconnue. Nous avons déjà précisé que le domaine Fn3 semble porter la majorité de l'information, différente entre les pectate lyases homologues PelI et Pel3 (Chapitre 1 de Pineau *et al.*, 2014). En effet, Pel3 n'est pas sécrétée par le système Out de *D. dadantii* et l'hybride Fn3(PelI)/Cat(Pel3) qui contient le domaine Fn3 de PelI et domaine catalytique de Pel3 est beaucoup mieux sécrété que l'hybride inverse Fn3(3)/Cat(I). Cependant, ce dernier hybride est sécrété quand même plus efficacement par *D. dadantii* que la protéine Pel3 native (Figure 2B, Pineau *et al.*, 2014). Ces derniers résultats suggèrent que le domaine catalytique de PelI possède aussi quelques déterminants de la sécrétion spécifiquement reconnus par le système Out de *D. dadantii*. Ceci fait du domaine catalytique une cible intéressante pour le pontage dirigé *in vivo*.

Nous avons choisi neuf résidus dans le domaine catalytique : N145, D146 et K149 (boucle A), K215, Y218, K221 et D223 (boucle B), K317 et Q319 (boucle C) (Figure 33).

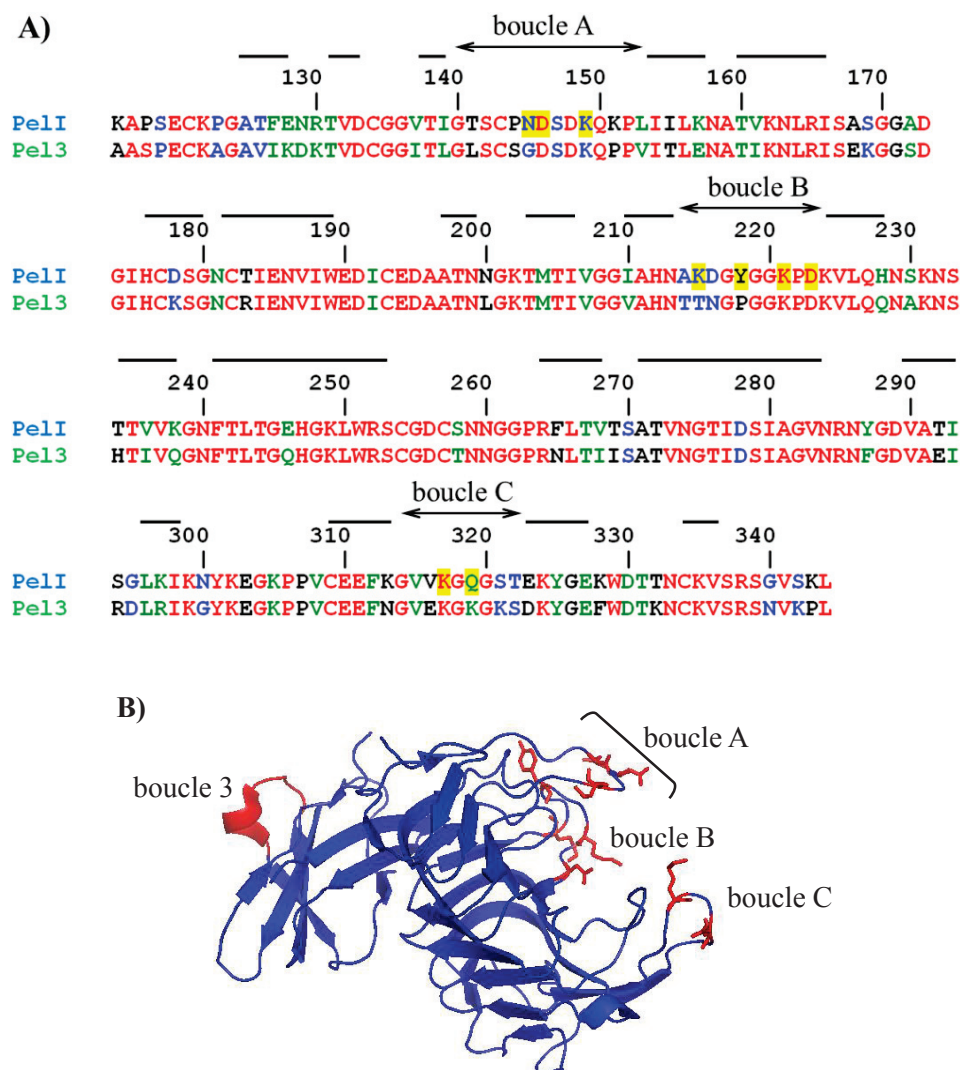


Figure 33. Positions dans le domaine catalytique de PelI sélectionnées pour l'incorporation du *pBpa*.

A) Alignement des séquences des domaines catalytiques de PelI et Pel3. Les résidus sélectionnés pour l'incorporation du *pBpa* sont soulignés en jaune, les brins β sont affichés comme les traits noirs, les boucles, avec les flèches. B) Structure de PelI avec les résidus sélectionnés pour l'incorporation du *pBpa* présentés en rouge. La boucle 3 du domaine Fn3 est indiquée en rouge.

Tout d'abord, la production de ces variants en présence et en absence du *pBpa* a été analysée chez *E. coli* (Pineau *et al.*, 2014, Figure S5, panel droit, p.236). De façon étonnante, les variants portant le codon TAG à la place de codons de Y218, K221 et D223 ont généré, en absence du *pBpa*, une forme courte qui correspond à l'arrêt de la traduction par le codon TAG ainsi introduit. En présence du *pBpa*, ces variants ont généré deux formes, une forme courte, déjà mentionnée, et une forme entière, issue de la traduction complète et de l'incorporation du *pBpa* à la place de ces résidus.

Par la suite, la sécrétion de tous ces variants de PelI a été analysée chez *D. dadantii* en présence du *pBpa* (Figure 34). Les variants N145, D146, K149, K317 et Q319 n'ont généré

qu'une forme entière qui, à l'exception du Q319 a été bien sécrétée (Figure 34 panel en haut). Par contre, les variants Y218, K221 et D223 ont de nouveau généré les deux formes (Figure 34 panel en bas). Leurs formes entières n'ont pas été très abondantes mais ont été plus tôt bien sécrétées. De plus, leurs formes courtes ont été aussi partiellement sécrétées par le T2SS. Effectivement, on peut constater qu'une protéine cellulaire de 55 kDa (indiquée avec une étoile et utilisée comme contrôle négatif) ne passe pas dans le surnageant.

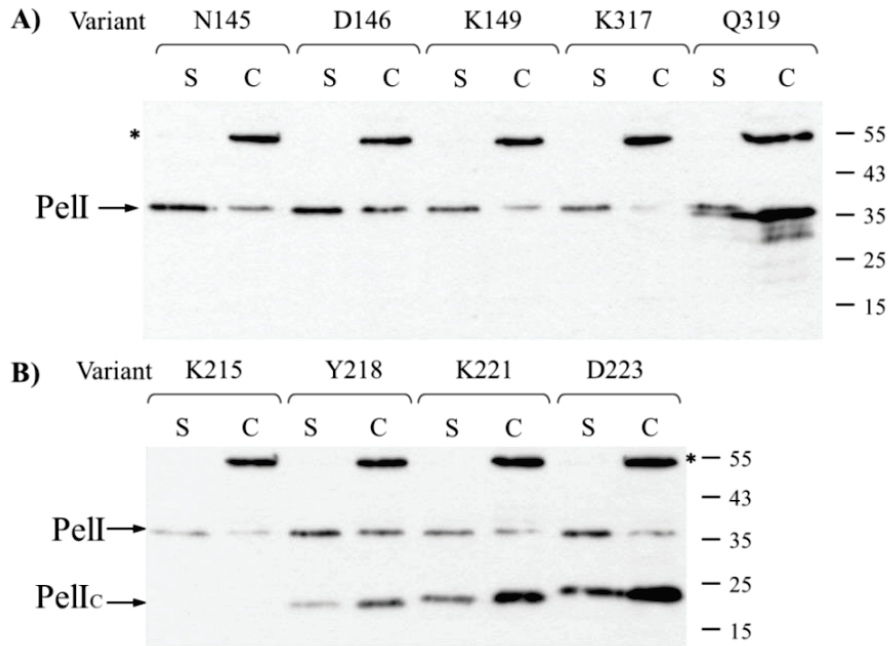


Figure 34. Test de sécrétion de variants de PelI portant le *pBpa* dans le domaine catalytique.

Les cellules de *D. dadantii pelI*⁻ A3776 ont été transformées avec pSup-BpaRS-6TRN et pTdB-PLI_{TAG}-oCDS. Le résidu de PelI substitué dans ce dernier plasmide est indiqué en haut. Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles indiquées dans Figure 14 et analysées de la même manière par immunodétection avec des anticorps dirigés contre PelI. Les positions de protéines PelI entières et tronquées (PelI_c) sont indiquées avec les flèches. La quantité de protéines détectée dans le surnageant (S) indique l'efficacité de la sécrétion. Une protéine non-spécifique (indiquée avec une étoile) indique l'absence d'une fuite cellulaire.

Le pontage UV réalisé dans les mêmes conditions a permis d'observer des complexes formés par certains de ces variants, notamment N145, D146, Q319 (Figure 35A), Y218, K221 et D223 (Figure 35B). La présence d'une bande d'une taille d'environ 120 kDa a été observée pour les substitutions de N145, D146 et Y218. Ce complexe pourrait être formé avec la sécrétine OutD, car sa taille est proche des complexes PelI-OutD observés pour PelI D58*pBpa* et PelI A109*pBpa*. Cependant, l'analyse de ces échantillons avec des anticorps dirigés contre OutD n'a pas donné une réponse positive (Figure 35A, panel droit). Il pourrait donc s'agir d'un complexe de PelI avec une autre protéine.

Plusieurs bandes ont été observées avec les variants Pell K221pBpa et Pell D223pBpa notamment : une d'environ 70 kDa et une autre, vers 50 kDa (Figure 35B, indiquées avec un triangle blanc et un point noir, respectivement). De plus, plusieurs bandes moins intenses situées entre 45 Da et 40 kDa pourraient correspondre aux produits de dégradation d'un de ces complexes initiaux. L'analyse des mêmes échantillons avec des anticorps dirigés contre OutC à permis de démontrer que le complexe de 70 kDa serait formé avec OutC (Figure 35B panel droit). Par ailleurs aucun complexe spécifique n'a été détecté avec les anticorps dirigés contre OutD (non montré).

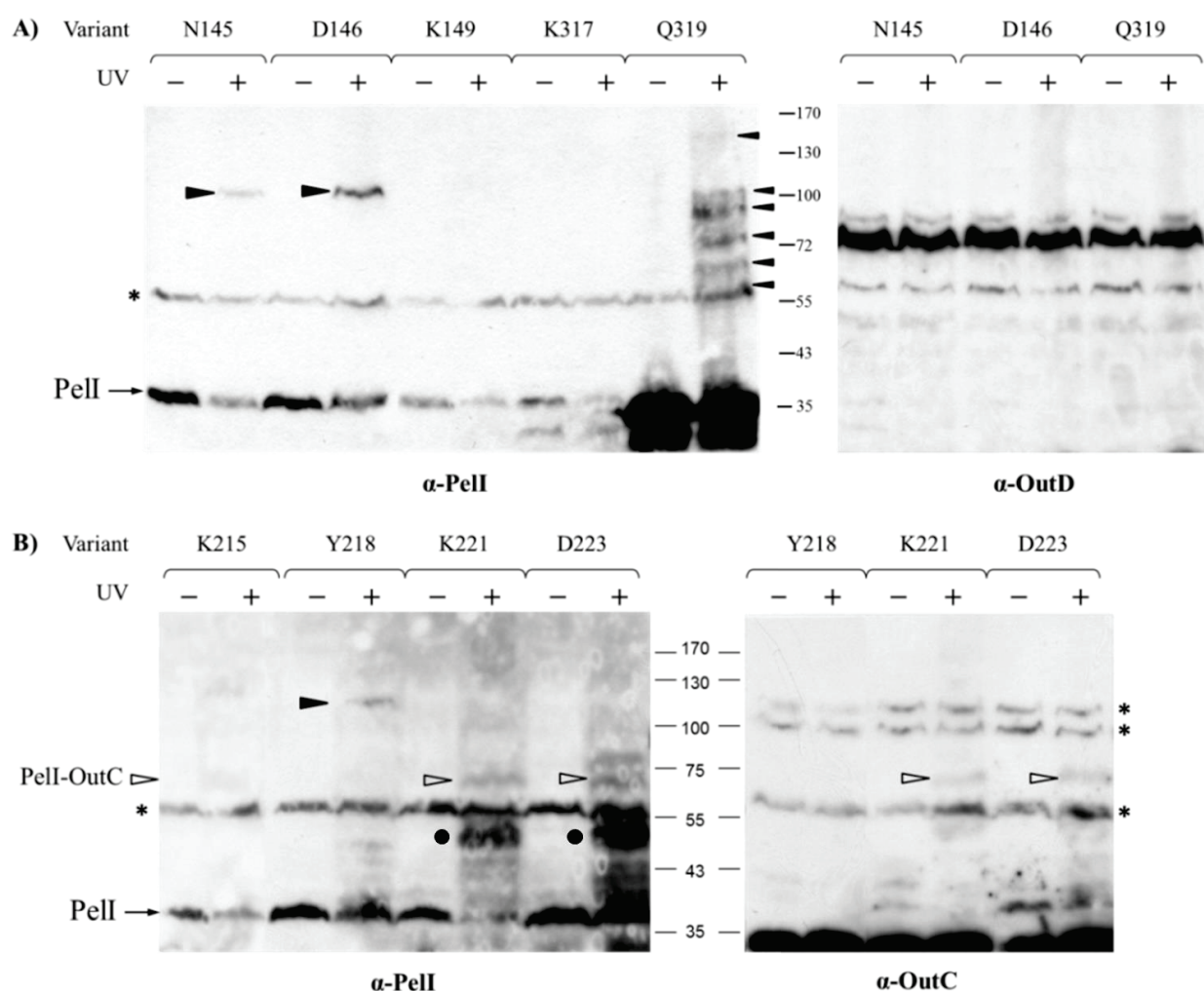


Figure 35. Pontage dirigé du domaine catalytique de Pell chez *D. dadantii* *pelI*

Les cultures de *D. dadantii pelI* A3776 portant les mêmes plasmides que dans la figure 34 ont été réalisées dans les mêmes conditions. Les cellules ont été ensuite prélevées et exposées aux UV pendant 3 min (+) ou non, (-) et analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre Pell, OutD et OutC. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles et les points, les bandes non-spécifiques, avec les étoiles.

Par la suite, je me suis intéressé plus en détails à la sécrétion de formes courtes générées par les substitutions de Y218, K221 et D223 car le test de sécrétion (Figure 34) a montré que ces

formes sont secrétées par le T2SS. J'ai donc réalisé les tests de sécrétion en absence du *pBpa* dans le milieu, lorsque seules les formes courtes de Y218, K221 et D223 sont produites (Figure 36). Par contre, le variant PelI D146TAG, utilisé comme un contrôle négatif, n'est pas produit en absence de *pBpa*.

On peut constater que les formes courtes de variants Y218, K221 et D223 sont sécrétées avec une efficacité comparable à celle de PelI sauvage (Figure 36). La production de formes courtes n'influence pas la sécrétion des pectate lyases natives, PelD et PelE (Figure 36), et en absence d'un T2SS fonctionnel, dans une souche *D. dadantii* $\Delta outC$, les formes courtes ne sont plus sécrétées (non montré).

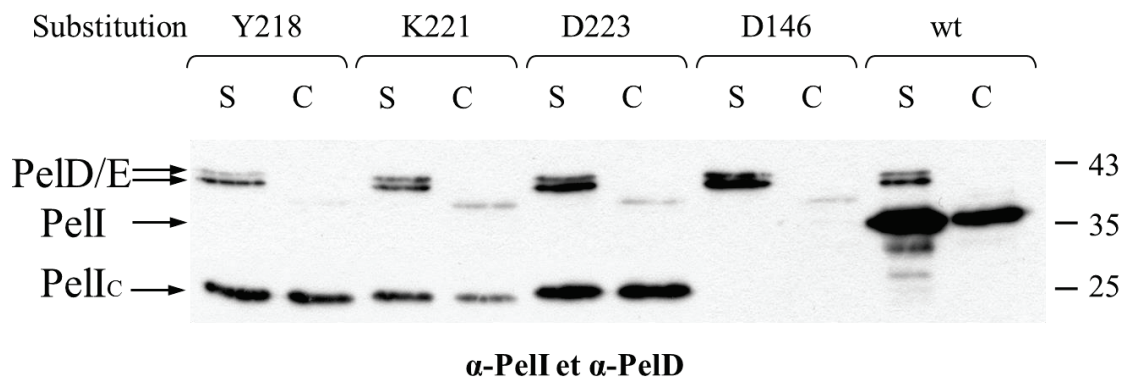


Figure 36. Test de sécrétion de formes courtes de PelI.

Les cellules de *D. dadantii pelI* ont été transformées uniquement avec le plasmide pTdB-PLI_{TAG}-oCDS. Les résidus substitués par le codon TAG sont indiqués en haut de la figure. Les cultures ont été réalisées pendant 8 heures dans BL avec du galacturonate mais sans *pBpa*. Les surnageants et cellules ont été séparés par centrifugation et analysés par immunodétection avec des anticorps dirigés contre PelI et PelD. La quantité de protéines détectée dans le surnageant (S) indique l'efficacité de la sécrétion. Les positions de PelI entière (PelI), sa forme courte (PelIc) et les pectate lyases PelD et PelE sont indiquées avec les flèches.

On peut donc conclure que les formes courtes de PelI se comportent comme les vrais substrats de T2SS. Pourtant, si on compare la structure d'une PelI courte avec celle de PelI entière, on peut constater qu'une moitié du domaine catalytique est absente dans la version courte (Figure 37). Cependant, la version courte de PelI possède toujours la boucle 3 du domaine Fn3, le motif suggéré interagir avec le domaine PDZ d'OutC.

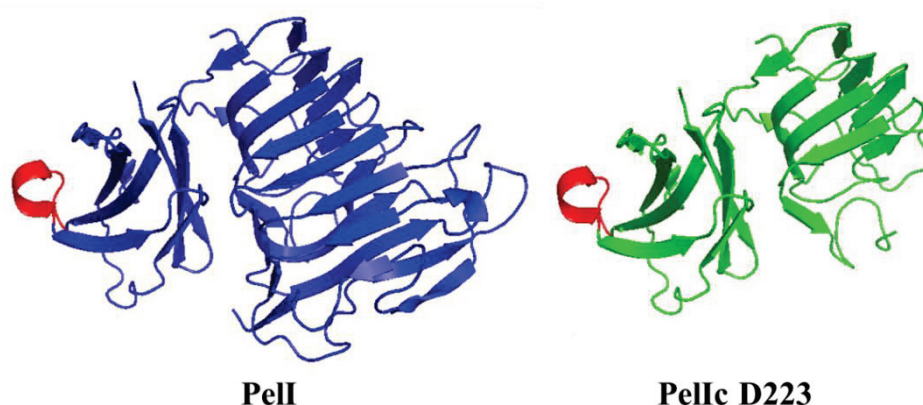


Figure 37. Structures de PelI entière et une de forme courte (PelIc D223).

La structure de PelI est présentée en bleu, la structure de la PelI tronquée à partir du résidu D223 est en vert. La boucle 3 est indiquée en rouge.

Une expérience supplémentaire a donc été réalisée pour vérifier si la sécrétion de la forme courte de PelI est toujours dépendante du domaine PDZ d'OutC (Figure 38). Dans ce but, la sécrétion de formes courtes PelIc K221 et PelIc D223 a été testée chez *D. dadantii* $\Delta outC$ A5413 dans deux contextes différents, 1) en présence d'une version sauvage d'OutC ou 2) en présence d'une version OutC_{ΔPDZ} qui ont été exprimées sur le même plasmide que la PelI mutée. On peut remarquer que la sécrétion des formes courtes de PelI est affectée en absence du domaine PDZ (Figure 38 ; comparer pistes 1 avec 2 et 3 avec 4). La sécrétion des pectate lyases natives, PelD et PelI, utilisées comme contrôle positive, est complètement arrêtée en absence du domaine PDZ. Ces résultats démontrent donc que malgré l'absence d'une partie importante de la protéine, les formes courtes de PelI sont toujours prises en charge par le T2SS et interagissent correctement avec le domaine PDZ d'OutC. Ce substrat minimal du T2SS présente donc un modèle très attractif pour de futures études.

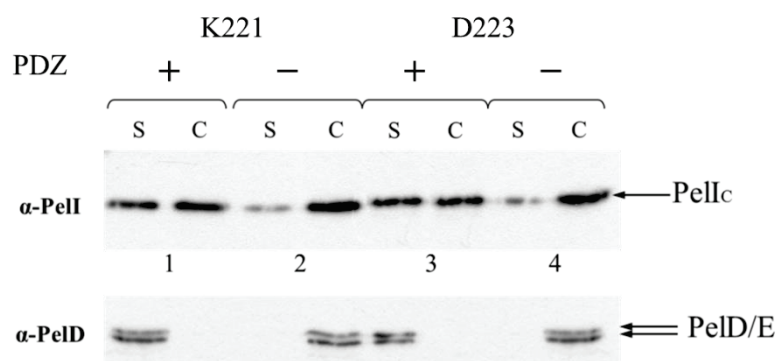


Figure 38. Sécrétion de formes courtes de PelI en présence et en absence du domaine PDZ d'OutC.

L'expérience a été réalisée dans une souche de *D. dadantii* *pelI* $\Delta outC$ A5413 transformée avec et soit pTdB-PLI_{TAG}-oCDS (PDZ +), soit pTdB-PLI_{TAG}-oC_{ΔPDZ}DS (PDZ -). Les résidus substitués par le codon

TAG sont indiqués en haut de la figure. Les cultures ont été faites dans les mêmes conditions que celles indiquées dans Figure 36 et analysées de la même manière par immunodétection avec des anticorps dirigés contre PelI et PelD. La quantité de protéines détectée dans le surnageant (S) indique l'efficacité de la sécrétion. Les positions de PelI court (PelIc) et des pectate lyases PelD et PelE sont indiquées par des flèches.

En conclusion, le pontage dirigé *in vivo* en utilisant la protéine PelI marquée par le *pBpa* a permis de mettre en évidence les interactions suivantes :

1. la boucle 3 du domaine Fn3 interagit avec le domaine PDZ d'OutC.
2. la boucle 3 du domaine Fn3 interagit avec la sécrétine OutD.
3. la boucle 3 et les autres régions non-structurées du domaine Fn3 et du linker entre les deux domaines sont systématiquement impliquées dans l'interaction avec un partenaire inconnu. La taille du complexe formé (~80 kDa) suggère qu'il peut s'agir d'une protéine d'environ 40 à 50 kDa. La nature de cette protéine reste à déterminer.
4. une autre région au sein de domaine catalytique (boucle C) est aussi impliquée dans l'interaction avec OutC.
5. le linker situé entre les deux domaines de PelI est impliquée dans l'interaction avec la sécrétine OutD.

Ces résultats démontrent donc une implication directe de deux composants, OutC et OutD, dans l'interaction avec une protéine à sécréter (PelI) lors du processus de sa sécrétion et indiquent que les zones non structurées de PelI seront en contact direct avec ces composants. Une de ces régions de PelI, la boucle 3, interagit au même temps avec le domaine PDZ d'OutC et avec la sécrétine OutD. Par ailleurs, les zones non structurées de PelI seront également en contact avec d'autres protéines de *D. dadantii* dont la nature reste à déterminer. Il n'est donc pas exclu, qu'après son arrivée dans le périplasme mais avant le recrutement par la machinerie T2SS, les protéines à sécréter soient momentanément prises en charge par quelques autres protéines.

IV. Pontage dirigé *in vivo* de la protéine OutC.

OutC est un composant du T2SS situé dans la membrane interne. Cette protéine est particulièrement importante pour le fonctionnement du système et est impliquée dans les nombreuses interactions au sein de T2SS (Korotkov *et al.*, 2006; Login *et al.*, 2010 ; Douzi *et al.*, 2011; Korotkov *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2012). OutC est une protéine bitopique, elle possède une courte région cytoplasmique, un segment transmembranaire (TMS) et une large région périplasmique. La partie périplasmique d'OutC est composée de deux domaines : HR et PDZ. Le domaine HR est impliqué dans de nombreuses interactions avec la sécrétine OutD (Korotkov *et al.*, 2006; Login *et al.*, 2010 ; Douzi *et al.*, 2011; Korotkov *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2012). Le domaine PDZ est un module optionnel, qui n'est pas présent dans tous les GspC (Chapitre VIII.4.3.2). Chez *D. dadantii*, le domaine PDZ est indispensable à la sécrétion des pectate lyases majeures et assure la spécificité de leur sécrétion (Bouley *et al.*, 2001). Comme en général, les domaines PDZ sont impliqués dans diverses interactions protéine-protéine, le PDZ d'OutC a aussi été soupçonné d'interagir avec ses substrats. Cependant, aucune interaction impliquant le PDZ de GspC n'a été démontrée. De plus, certains substrats (PemA et CelZ) sont sécrétés par le système Out de *D. dadantii* même en absence du domaine PDZ. Ceci suggère que ce domaine joue un rôle particulier vis-à-vis d'un groupe des substrats.

Dans les chapitres suivants, j'ai utilisé la technique du pontage dirigé *in vivo* afin d'analyser les interactions de ces deux domaines périplasmiques d'OutC, PDZ et HR, avec les autres composants du système et les protéines sécrétées. La majorité de ces expériences a été réalisée chez *E. coli* car en cette période de ma thèse, la technique de pontage dirigé *in vivo* chez *D. dadantii* n'avait pas encore été mise au point.

IV.1. Pontage dirigé *in vivo* du domaine PDZ.

Tout d'abord, nous avons utilisé le domaine PDZ comme une cible pour incorporer le pBpa. L'interaction des domaines PDZ eucaryotes avec leurs substrats est effectuée grâce à la fixation d'un brin- β antiparallèle dans le site actif du domaine. Ce site de fixation est présenté par l'hélice α B et les brins β A et β B (Chapitre VIII.4.3.2, p.81). De plus, la séquence GLGF située dans la boucle à côté du brin β B, joue un rôle important dans l'interaction avec le substrat. Par contre, le domaine PDZ de protéines GspC ne possède pas une telle séquence GLGF (Korotkov *et al.*, 2006) et dans ce cas là, l'interaction avec le substrat pourrait s'effectuer autrement. L'étude structurale du domaine PDZ de *V. cholerae* a suggéré que le site actif de ce domaine est assez large et pourrait fixer une hélice α externe (Korotkov *et al.*, 2006 ; et Chapitre VIII.4.3.2. p. 83).

Après une analyse des séquences des domaines PDZ de différents GspC, nous avons choisi dix résidus situés au sein du site actif potentiel (Figure 39A et 39B). Nous avons exploité le brin β A (P192 et M194), β B (K198 et L199), l'hélice α B (A235, E236, K239, M242 et E243) et A246.

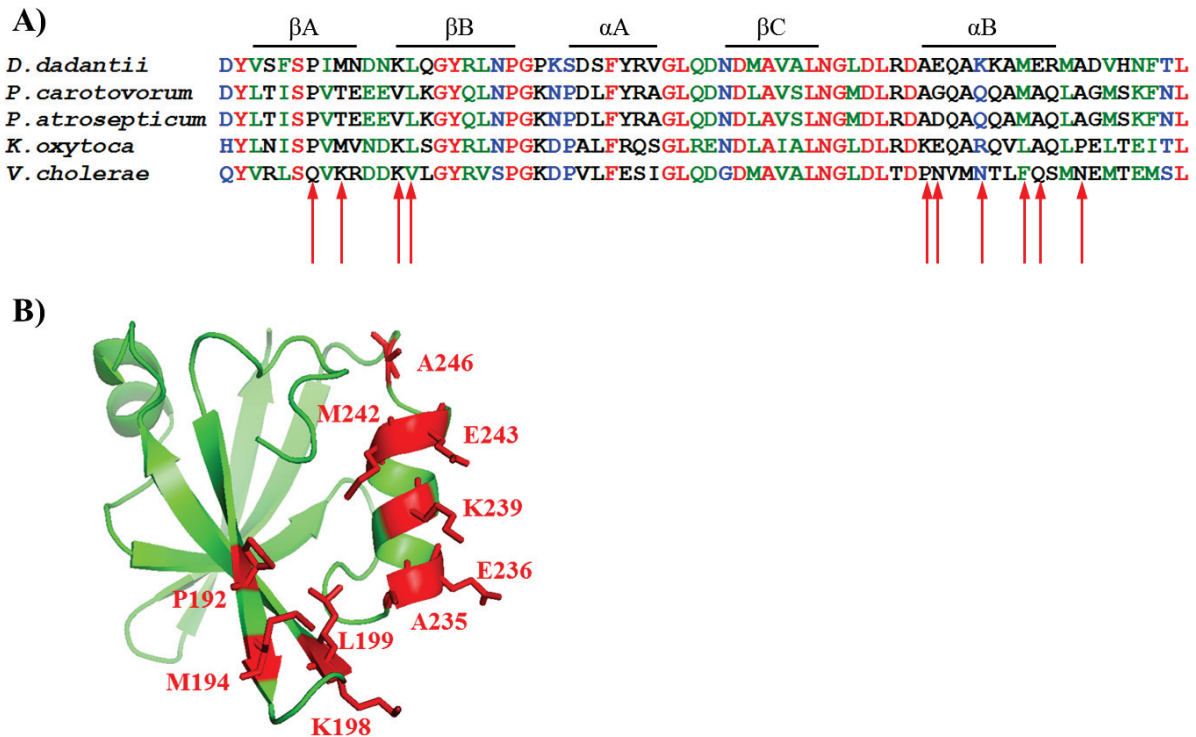


Figure 39. Résidus dans le domaine PDZ sélectionnés pour l'incorporation du *pBpa*.

A) Alignement des séquences des domaines PDZ de protéines GspC de différents T2SSs. Les résidus sélectionnés pour l'incorporation du *pBpa* sont indiqués avec les flèches rouges. B) Structure du domaine PDZ d'OutC de *D. dadantii* avec les résidus sélectionnés présentés en rouge.

Tout d'abord, nous avons testé la production de ces variants en présence et en absence du *pBpa* chez *E. coli* MC4100 (Figure 40). Les variants portant les substitutions à la place de résidus P192, M194, K198 et L199 ont été produits même en absence du *pBpa*. De plus, dans cette condition, on détecte deux formes de la protéine : une forme entière et une forme courte. La forme courte est produite à cause d'arrêt de traduction par le codon TAG introduit. La forme entière en absence du *pBpa* est produite grâce à la translecture traductionnelle (« read through ») et contient un autre acide aminé à la place du codon TAG. Ainsi, même si en présence du *pBpa* seule la forme entière d'OutC est produite, on ne peut pas estimer si le *pBpa* a été bien incorporé ou non (Figure 40). Par conséquent, ces variants d'OutC n'ont pas été utilisés par la suite.

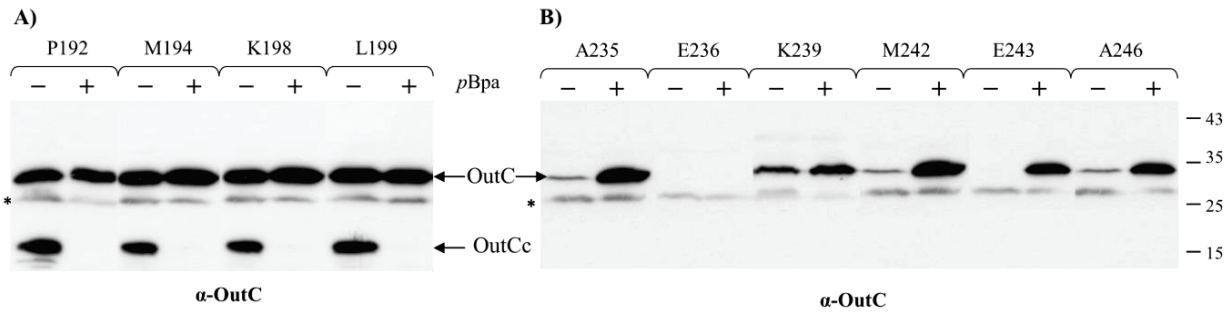


Figure 40. Efficacité de l'incorporation du pBpa dans le domaine PDZ chez *E. coli* MC4100.

Les cellules d'*E. coli* MC4100 ont été transformées avec deux plasmides, pSup-BpaRS-6TRN et pTdB-PLI-oC_{TAG}DS. Le résidu d'OutC substitué dans ce dernier plasmide est indiqué en haut. Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles dans Figure 12, en absence (-) ou en présence (+) de pBpa 1mM, et analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre OutC. Les positions de protéines OutC entière et tronquée (OutCc) sont indiquées avec les flèches, la bande non-spécifique, avec une étoile.

Par contre, pour la majorité des variants portant les substitutions dans hélice α B, la translecture traductionnelle a été très faible (A235, M242 et A246) ou inexistante (E243) (Figure 40B). Ces variants, à l'exception d'OutC E236, n'ont été massivement produits qu'en présence du pBpa indiquant son incorporation spécifique dans ces protéines. Ces variants ont donc été utilisés pour le pontage dirigé. Cependant, afin d'éviter toute interférence possible des formes minoritaires sans pBpa, ces expériences ont été réalisées en présence et en absence du pBpa (Figure 41).

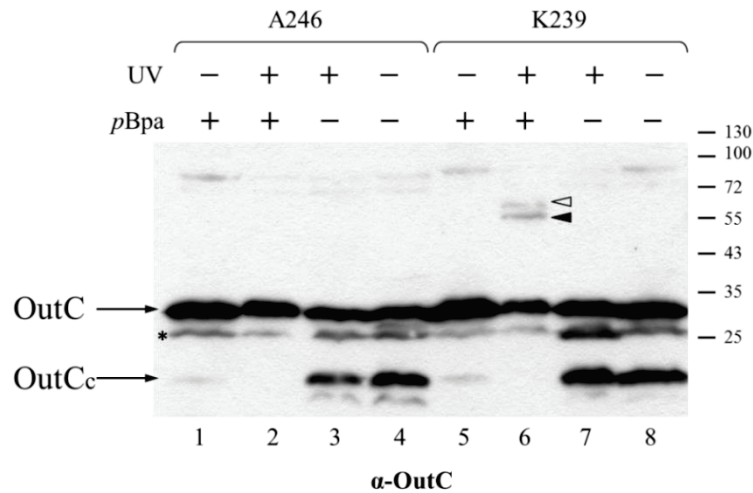


Figure 41. Pontage dirigé ciblant l'hélice- α B du domaine PDZ d'OutC.

Les cellules d'*E. coli* MC4100 ont été transformées avec deux plasmides, pSup-BpaRS-6TRN et pTdB-PLI-oC_{TAG}DS. Le résidu d'OutC substitué dans ce dernier plasmide est indiqué en haut. Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles indiquées dans Figure 13. Les cellules ont été ensuite prélevées et exposées aux UV pendant 3 min (+) ou non (-) et analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre OutC. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles. Les

positions de protéines OutC entière et tronquée (OutC_C) sont indiquées avec les flèches, la bande non-spécifique, avec une étoile.

Dans ces expériences, réalisées chez *E. coli*, le variant d'*outC* d'intérêt a été co-exprimé avec les gènes *outD*, *outS* et *pelI* à partir du même plasmide pTdB-PLI-oCDS (Figure 41). Deux complexes, d'une taille d'environ 55 et 65 kDa, ont été observés avec le variant OutC K239pBpa. Ces complexes n'ont été formés qu'en présence du pBpa et suite à l'irradiation des cellules par UV indiquant leur nature spécifique. L'analyse de ces complexes avec des anticorps dirigés contre PelI et OutD n'a pas donné une réponse positive (non montré). Ceci peut suggérer que ces deux complexes sont formés grâce à la dimérisation d'OutC via le domaine PDZ ou par l'interaction avec une (des) protéine(s) d'*E. coli*. Par contre, aucun complexe spécifique n'a été détecté avec aucun autre variant ici testé (par exemple, OutC A246pBpa sur Figure 41).

Pour analyser plus en détail les conditions de formation des complexes par le variant OutC K239pBpa, j'ai testé l'influence d'autres composants de système Out et des pectinases. Dans ce but, les composants de la membrane interne OutL et OutM et l'ATPase OutE, ont été co-exprimés avec le variant OutC K239pBpa en présence et en absence de la sécrétine OutD et les pectate lyases PelI et PelB (Figure 42).

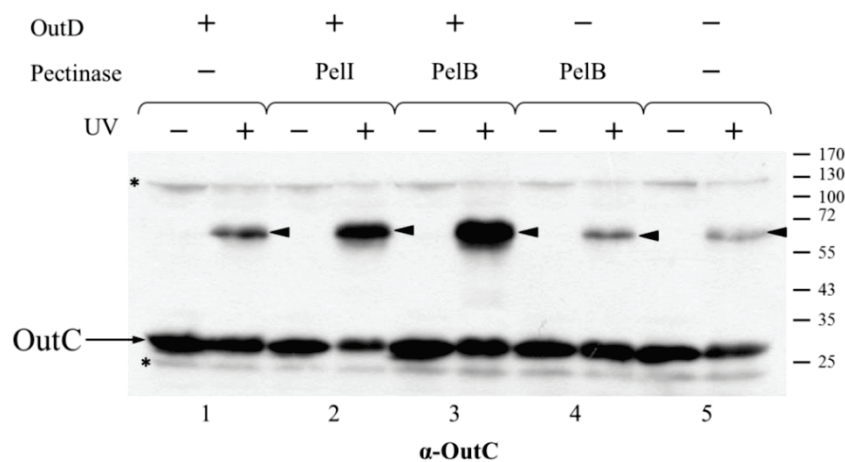


Figure 42. Effet d'OutD et de pectinases sur la formation du complexe par OutCK239pBpa.

Les cellules d'*E. coli* MC4100 ont été transformées avec les plasmides pSup-BpaRS-6TRN, pBAD:ELM et un troisième plasmide portant *outC*239TAG soit seule, soit avec *outD*, soit avec *pelB* soit avec *pelI*, soit avec *outD* et *pelI* (la présence d'OutD et/ou de la protéine sécrétée est indiquée en haut). Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles dans Figure 13. Les cellules ont été ensuite prélevées et exposées aux UV pendant 3 min (+) ou non (-) et analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre OutC. Le complexe formé est indiqué avec un triangle. La position d'OutC est indiquée avec une flèche, la bande non-spécifique, avec une étoile.

Tout d'abord, on peut constater qu'en présence d'OutE, L, M dans cette expérience, un seul complexe est formé (Figure 42). Il correspond au complexe de plus haut poids moléculaire observé en absence d'OutE, L, M (Figure 41, triangle blanc). Ceci suggère que la présence de

composants de la membrane interne stabilise OutC et empêche la dégradation du complexe formé par OutCK239*pBpa*. Par ailleurs, l'abondance de ce complexe dépend fortement de la présence d'une protéine sécrétée (PelI ou PelB) et de la sécrétine OutD. De plus, la quantité du complexe est encore plus importante en présence simultanée d'OutD et d'une pectate lyase (Figure 42 ; comparer pistes 1, 4 et 5 avec pistes 2 et 3). Néanmoins, l'utilisation des anticorps dirigés contre OutD, PelI et PelB a montré que ces protéines ne font pas partie du complexe observé (non montré).

Ainsi, les résultats de ces pontages réalisés chez *E. coli* suggèrent que la formation du complexe par le variant OutC K239*pBpa* est dépendante de la présence simultanée d'une protéine sécrétée et de la sécrétine OutD qui ne font pas, cependant, partie du complexe. Une des explications probables semble être que la présence de ces protéines renforce l'homodimérisation d'OutC par le domaine PDZ. Il est aussi possible que ces conditions miment une des étapes fonctionnelles du T2SS.

Dans le but d'analyser ces interactions au sein d'un système de sécrétion fonctionnel, le pontage dirigé a été effectué dans une souche de *D. dadantii* $\Delta outC$. Un allèle d'*outC* portant le codon TAG à la place de résidus d'intérêt a été exprimé sur un plasmide, soit seul, soit avec *outD* et *pelB*. Contrairement à ce qui a été observé chez *E. coli* (Figure 40), l'incorporation du *pBpa* à la place de lysine 239 est très efficace et spécifique chez *D. dadantii* (Figure 43). Aucune translecture traductionnelle n'a été détectée : la version mutée d'OutC n'a été produite qu'en présence du *pBpa* dans le milieu (Figure 43 ; comparer pistes 1 et 3, 4 et 6). Suite à l'irradiation des cellules par UV, un complexe spécifique a été formé par le variant OutC K239*pBpa*, mais pas par la version sauvage d'OutC (Figure 43). La taille de ce complexe correspond à celle observée chez *E. coli* (Figures 41 et 42) et il aurait donc la même nature. Effectivement, ici, comme chez *E. coli*, une expression supplémentaire de PelB sur le plasmide a provoqué une augmentation de la quantité du complexe (Figure 43, comparer pistes 2 et 5).

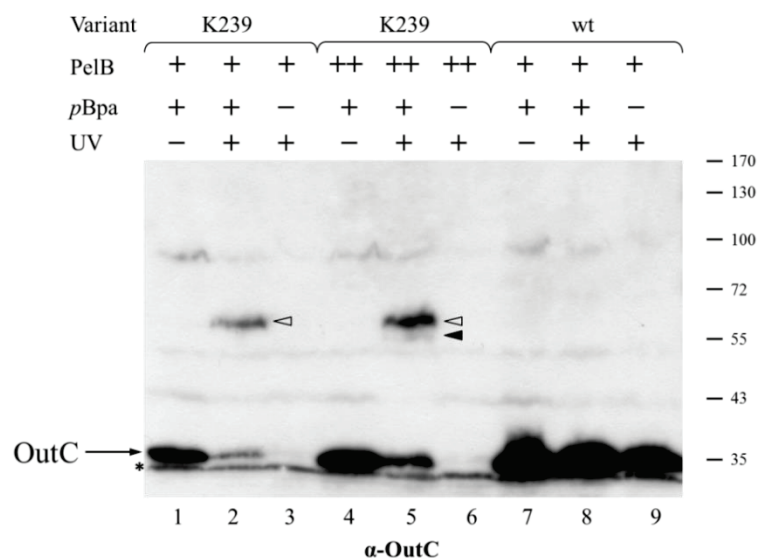


Figure 43. Pontage dirigé du variant OutC K239pBpa chez *D. dadantii* $\Delta outC$.

Les cellules de *D. dadantii* $\Delta outC$ A3556 ont été transformées par pSup-BpaRS-6TRN et le plasmide portant le gène *outC* sauvage ou *outCK239TAG* soit seul (PelB+), soit avec *pelB* et (PelB++). Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles indiquées dans Figure 13 en présence (+) ou absence (-) du pBpa. Les cellules ont été ensuite prélevées et exposées aux UV pendant 3 min (+) ou non (-) et analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre OutC. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles. La position d'OutC est indiquée avec une flèche, la bande non-spécifique, avec une étoile.

Vu que l'incorporation du pBpa dans OutC K239TAG est plus efficace chez *D. dadantii* que chez *E. coli*, certains autres variants d'OutC ont aussi été analysés chez *D. dadantii* (Figure 44), notamment ceux portant les substitutions dans les brins βA et βB : P192, M194, K198 et L199 (Figure 39). Ces résidus sont situés dans le site de fixation potentiel de PDZ et peuvent donc d'être impliqués dans l'interaction avec le substrat.

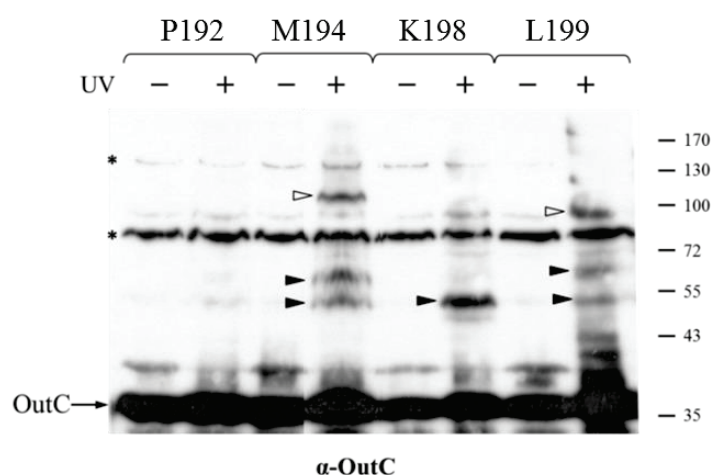


Figure 44. Pontage dirigé du domaine PDZ d'OutC (brins βA et βB) chez *D. dadantii*.

Les cellules de *D. dadantii* $\Delta outC$ A3556 ont été transformées par pSup-BpaRS-6TRN et PLB-oC_{TAG}DS. Le résidu d'OutC substitué dans ce dernier plasmide est indiqué en haut. Les cultures ont été réalisées

dans les mêmes conditions que celles indiquées dans Figure 13. Les cellules ont été ensuite prélevées et exposées aux UV pendant 3 min (+) ou non (-) et analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre OutC. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles. La position de protéine OutC est indiquée avec une flèche, la bande non-spécifique, avec une étoile.

La formation de quelques complexes spécifiques a été observée avec les variants M194, K198 et L199 (Figure 44). Les profils de pontage ne sont pas vraiment similaires même si certaines bandes auront des positions similaires. Afin d'identifier les partenaires protéiques impliqués dans ces interactions, les tests supplémentaires ont été réalisés avec le variant OutC M194pBpa en utilisant des anticorps dirigés contre les pectate lyases PelB, PelD et PelI (Figure 45).

Cette analyse a démontré que trois bandes d'une taille entre 50, 60 et 100 kDa réagissent simultanément avec des anticorps dirigés contre OutC et contre la pectate lyase PelB (Figure 45B et C). La masse moléculaire apparente de 100 kDa semble dépasser celle attendue pour le complexe entre PelB et OutC. Cependant, comme cela a déjà été évoqué, à cause d'une forme non-linéaire, les complexes peuvent migrer d'une manière aberrante sur le gel SDS-PAGE. Dans ce cas, il semble probable que les deux autres complexes (~50 et 60 kDa) soient des produits de dégradation du complexe de 100 kDa. Effectivement, nos analyses du complexe formé entre PelI D58pBpa et OutC (Chapitre III.1.1.c et III.1.1.d) ont démontré une dégradation massive de ce complexe.

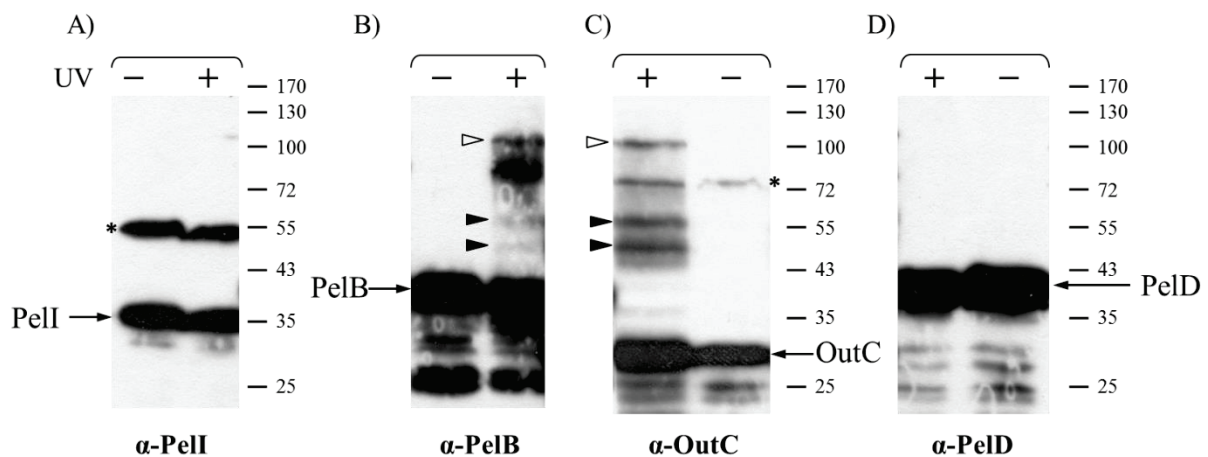


Figure 45. Pontage dirigé du variant OutC M194pBpa chez *D. dadantii* $\Delta outC$.

Les échantillons issus du pontage dirigé d'OutC M194pBpa présentés sur la Figure 44 ont été analysés en parallèle avec des anticorps dirigés contre PelI (A), PelB (B), OutC (C) et PelD (D). Les positions de PelI, PelB, PelD et OutC sont indiquées avec les flèches, les complexes formés avec les triangles, les bandes non spécifiques avec les étoiles.

Par contre, aucun complexe n'a été détecté avec des anticorps dirigés contre les pectate lyases PelI et PelD (Figure 45A et D). Puisque la sécrétion de ces deux pectate lyases, comme celle de

PelB, dépend de la présence du domaine PDZ, ces résultats ne semblent pas être très cohérents. On peut proposer quelques explications à cette incohérence apparente. Premièrement, même si on peut s'attendre à ce que le domaine PDZ d'OutC interagisse avec ces pectate lyases de manière similaire, leur position précise dans le site actif de PDZ ne sera pas exactement la même, compte tenu de divergences de leurs séquences. Dans ce cas, la proximité nécessaire au pontage ne serait pas atteinte entre OutC M194pBpa et PelD ou PelI. Deuxièmement, nous avons démontré l'existence d'une certaine hiérarchie de sécrétion : la pectate lyase PelD est sécrétée avant et plus efficacement que PelB, et PelB plus efficacement que PelI (Pineau *et al.*, 2014). Il est donc possible que le moment choisi pour l'exposition des cellules aux UV soit plus adapté à la sécrétion de PelB. Pour tester ces hypothèses, il faut réaliser un pontage plus systématique chez *D. dadantii* en utilisant d'autres positions dans le site actif du domaine PDZ et d'autres moments d'exposition aux UV.

En conclusion, le pontage dirigé du domaine PDZ au sein du T2SS fonctionnel a permis de démontrer que ce domaine (plus précisément le brin β A) est directement impliqué dans l'interaction avec la protéine sécrétée PelB. De plus, ces résultats suggèrent que la protéine OutC peut se dimériser via les domaines PDZ (plus précisément hélice α B). L'efficacité de dimérisation est améliorée en présence de la sécrétine OutD et des protéines à sécréter. La formation d'un tel dimère via les domaines PDZ peut correspondre à un état fonctionnel d'OutC au cours de la sécrétion.

IV.2. Pontage dirigé *in vivo* du domaine HR d'OutC.

Ces expériences ont été réalisées chez *E. coli*, car au moment où elles ont été effectuées la technique de pontage dirigé *in vivo* chez *D. dadantii* n'avait pas encore été mise au point.

IV.2.1. Pontage dirigé *in vivo* du linker entre les deux feuillets β du domaine HR d'OutC.

Le domaine HR d'OutC est constitué de deux feuillets β composé chacun de trois brins β et reliés entre eux par un linker de 11 résidus (Gu *et al.*, 2012). Le repliement du domaine HR d'OutC ressemble à celui du domaine périplasmique de PilP, un composant de système de pili de type IV, T4P (Gu *et al.*, 2012). Les deux domaines se superposent relativement bien au niveau des deux feuillets β tandis que l'organisation du linker est plus divergente (Figure 46). Notamment, la structure cristalline de PilP contient un brin β supplémentaire, β 4, qui est rarement observé dans la structure « in solution » du domaine HR d'OutC à cause d'une grande flexibilité de cette région (Gu *et al.*, 2012).

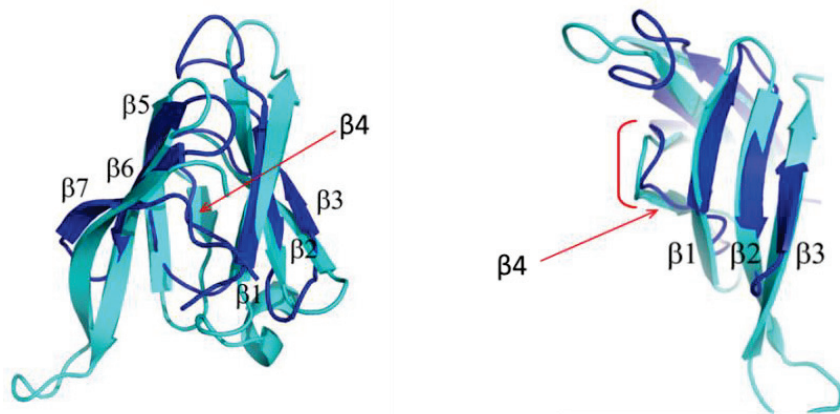


Figure 46. Superposition du domaine HR d'OutC et de la région périplasmique de PilP.

La structure du domaine HR d'OutC est présentée en bleu foncé et la structure de la région périplasmique de PilP en bleu clair. La superposition de deux structures est présentée en deux orientations. Le brin additionnel $\beta 4$ dans la structure de la région périplasmique de PilP est indiqué avec une flèche rouge. Une parenthèse rouge indique la région d'une interaction possible.

Une grande flexibilité de cette région peut suggérer la possibilité de sa structuration au contact avec une protéine partenaire, y compris un autre composant du T2SS ou une protéine à sécréter. De plus, cette région n'est pas bien conservée et peut donc être impliquée dans les interactions spécifiques d'un T2SS donné (Figure 47A). Les résidus dans le linker de HR sélectionnés pour l'incorporation du *pBpa* (N125, E126, E127, P129 et N132) sont bien exposés à la surface (Figure 47B).

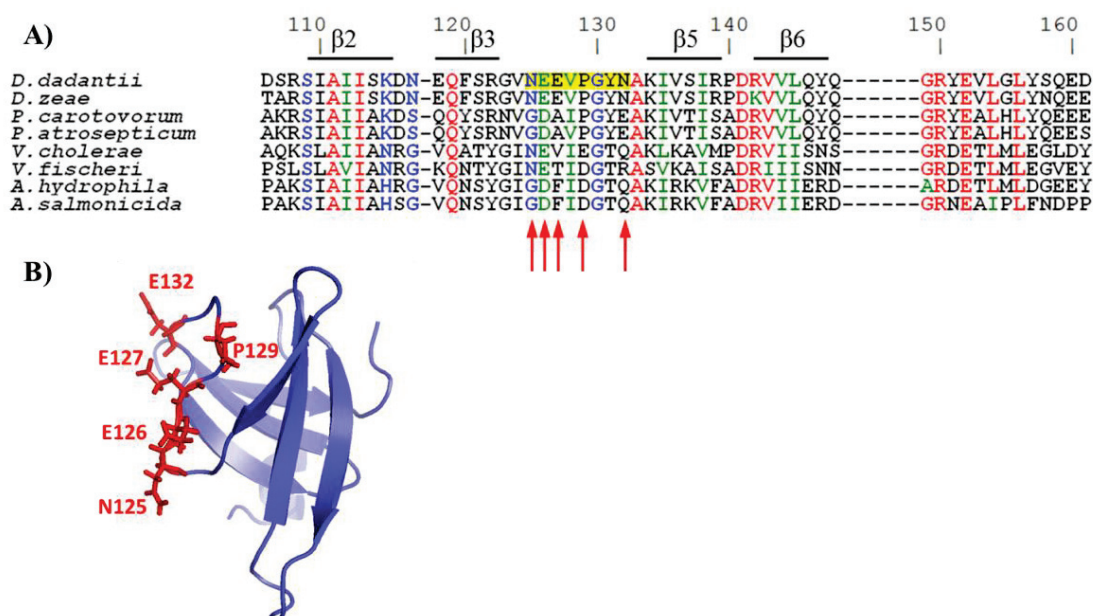


Figure 47. Résidus du linker du domaine HR d'OutC sélectionnés pour l'incorporation du *pBpa*

A) Alignement des séquences des domaines HRs de protéines GspC de différents T2SS. Les résidus substitués par le *pBpa* sont indiqués avec des flèches rouges. B) Structure du domaine HR d'OutC avec les résidus substitués en rouge.

Tout d'abord, les résidus choisis ont été substitués par le *pBpa* et la production de ces variants a été analysée chez *E. coli* MC4100 (Figure 48).

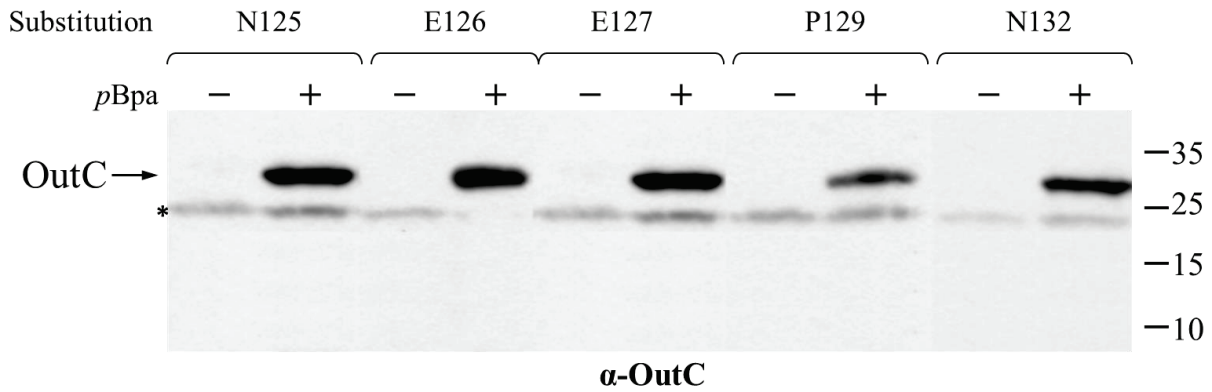


Figure 48. Efficacité de l'incorporation du *pBpa* dans le linker du domaine HR d'OutC.

Les cellules d'*E. coli* MC4100 ont été transformées avec pSup-BpaRS-6TRN et pTdB-oC_{TAG}DS. Les résidus d'OutC substitués dans ce dernier plasmide sont indiqués en haut. Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles dans la Figure 13 et analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre OutC.

Tous les variants d'OutC ont été bien produits en présence du *pBpa* (Figure 48, *pBpa* +). Au contraire, en absence du *pBpa* dans le milieu, aucun variant d'OutC n'a été produit (Figure 48, *pBpa* -). Ceci montre que l'incorporation du *pBpa* est efficace et spécifique et ces variants peuvent être utilisés pour le pontage dirigé *in vivo*.

Comme des études précédentes ont suggéré de multiples interactions entre le domaine HR et la sécrétine (Korotkov *et al.*, 2006 ; Login *et al.*, 2010 ; Douzi *et al.*, 2011 ; Korotkov *et al.*, 2011 ; Gu *et al.*, 2012), dans ces expériences de pontage, les variants d'OutC ont été systématiquement co-exprimés avec OutD. De plus, afin de reproduire certaines autres interactions d'OutC au sein du système T2SS, trois autres composants de la plateforme de membrane interne, OutE, OutL et OutM, ont été aussi co-exprimés. Ainsi, le pontage UV a été réalisé chez *E. coli* MC4100 dans les conditions de co-expression de variants d'OutC avec OutD et OutS (pTdB-oC_{TAG}DS) et avec OutE, OutL et OutM (pBAD:ELM).

Le pontage dirigé a permis d'observer des complexes formés par les variants portant le *pBpa* à la place de résidus E126, E127 et N132.

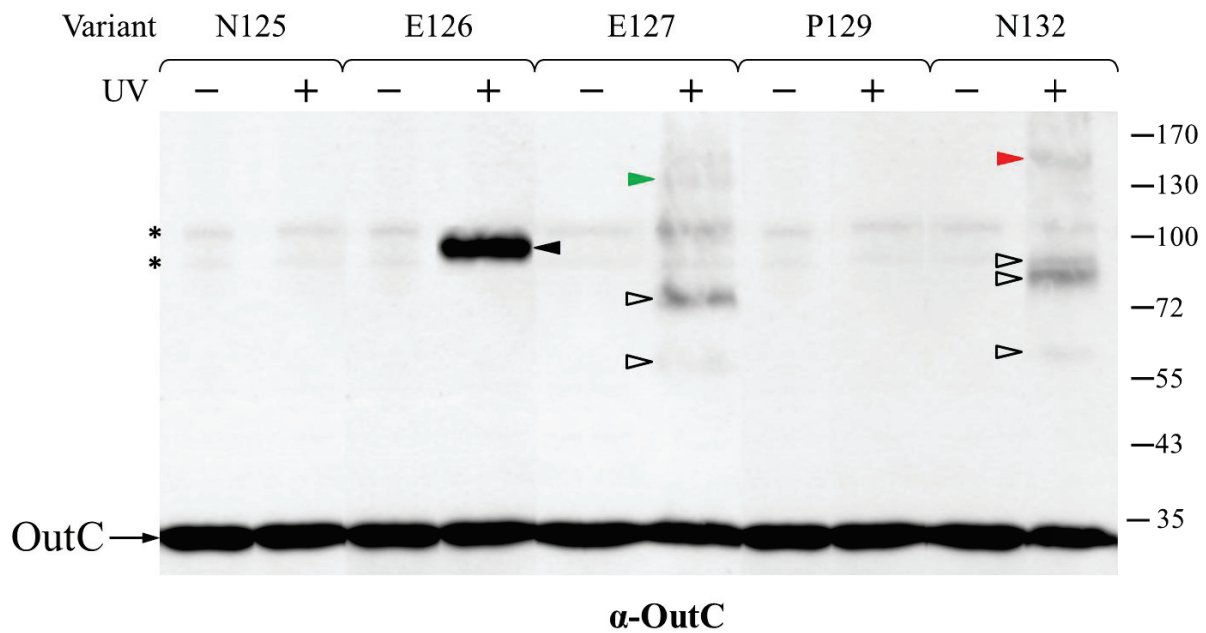


Figure 49. Pontage dirigé du linker du domaine HR d'OutC chez *E. coli* MC4100.

Les cellules d'*E. coli* MC4100 ont été transformées avec pSup-BpaRS-6TRN, pBAD:ELM et pTdB-oC_{TAG}DS. Le résidu d'OutC substitué dans ce dernier plasmide est indiqué en haut. Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles indiquées dans Figure 13 et analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre OutC. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles et les bandes non-spécifiques, avec les étoiles.

Remarquablement, le variant OutC E126pBpa génère un complexe très abondant d'une taille d'environ 80 kDa (Figure 49, piste 2). L'utilisation des anticorps dirigés contre OutD, OutL et OutM n'a pas donnée une réponse positive avec ce complexe (non montré). Sa taille apparente serait compatible avec l'homodimère d'OutC. Sinon, il pourrait s'agir de l'interaction avec une protéine non identifiée d'*E. coli*.

Les variants d'OutC portant le pBpa à la place de résidus E127 (Figure 49, ligne 3) et N132 (Figure 49, ligne 5) génèrent plusieurs complexes d'une abondance plus faible. Leurs profils ne sont pas similaires, mais dans les deux cas, on peut voir les complexes d'une taille d'environ 120 à 140 kDa qui peuvent correspondre à ceux entre OutC et OutD. Effectivement, l'analyse de ces mêmes échantillons avec des anticorps dirigés contre OutD a permis de démontrer qu'un des complexes formés par le variant OutC N132pBpa (~140 kDa) interagit avec deux types d'anticorps, dirigés contre OutC et OutD (Figure 50). Par contre, dans le cas d'OutC E127pBpa, aucun complexe n'a été observé avec des anticorps dirigé contre OutD.

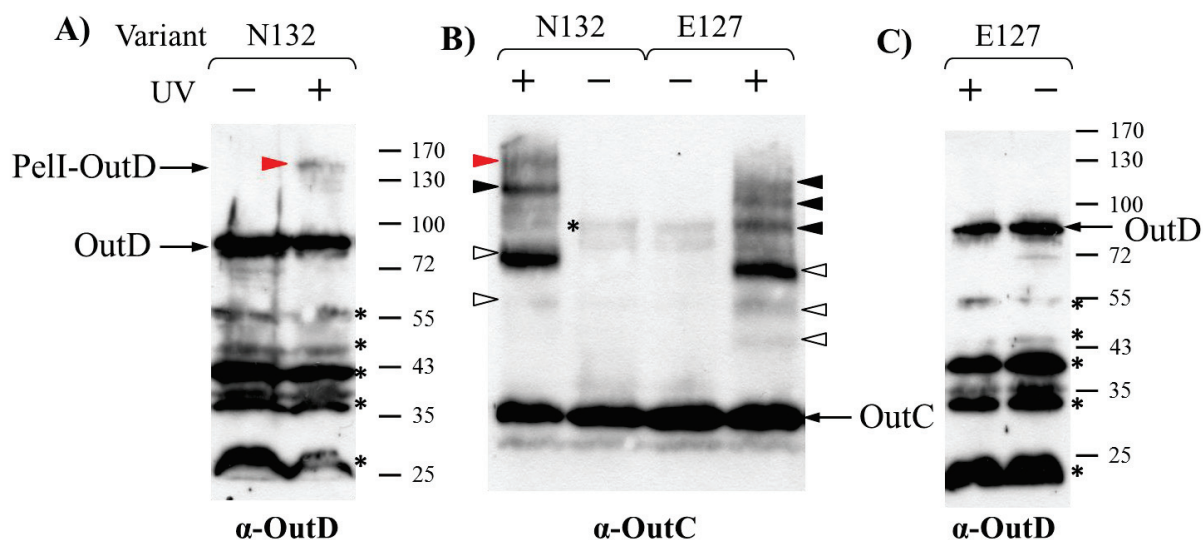


Figure 50. Pontage dirigé de variants OutC E127pBpa et OutC N132pBpa.

Le pontage dirigé avec les variants OutC E127pBpa et OutC N132pBpa a été réalisé chez *E. coli* MC4100 dans les mêmes conditions que dans la Figure 49 et analysé avec des anticorps dirigés contre OutC (B) et OutD (A et C). Les complexes formés sont indiqués avec les triangles et les bandes non-spécifiques, avec les étoiles.

Comme dans ces expériences, les variants d'OutC ont été co-exprimés chez *E. coli* avec la sécrétine OutD mais aussi avec les composants de la plateforme de membrane interne OutL, OutM et OutE, nous avons testé la nature de complexes formés avec les anticorps dirigés contre OutL et OutM. Si aucun complexe n'a été observé avec les anticorps dirigés contre OutM (non montré) un des complexes formés par le variant OutC E127pBpa semble interagir avec des anticorps contre OutL ce qui est compatible avec un complexe OutC-OutL (Figure 51A et B).

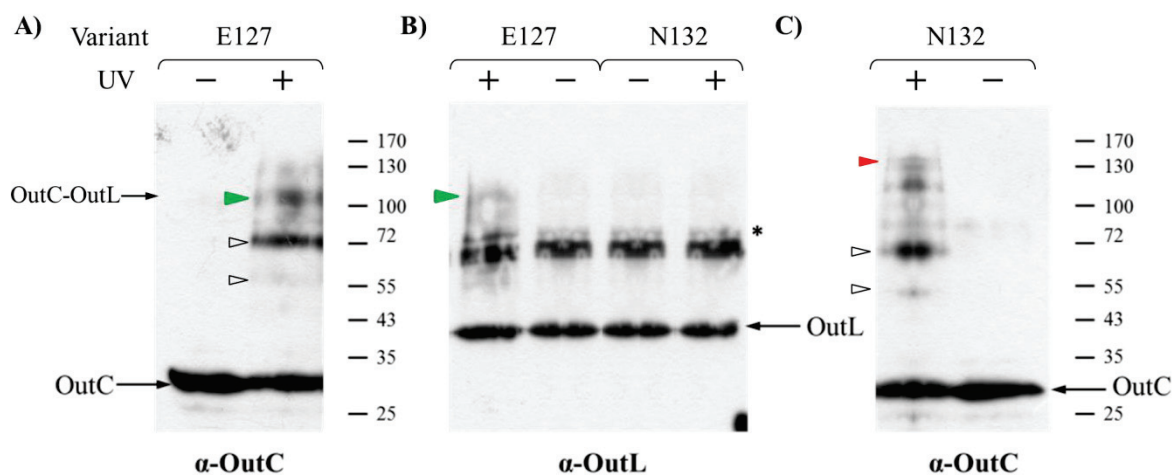


Figure 51. Pontage dirigé de variants OutC E127pBpa et OutC N132pBpa.

Le pontage dirigé des variants OutC E127pBpa et OutC N132pBpa a été réalisé chez *E. coli* MC4100 dans les mêmes conditions que dans la Figure 49 et analysé avec des anticorps dirigés contre OutC (A et

C) et OutL (B) Les complexes formés est sont indiqués avec les triangles et la bande non-spécifique, avec une étoile.

Afin de vérifier la nature exacte du complexe formé par OutC E127pBpa, j'ai effectué en parallèle le pontage dirigé de ces variants d'OutC en présence et en absence de composants OutE, OutL et OutM chez *E. coli* MC4100 (Figure 52).

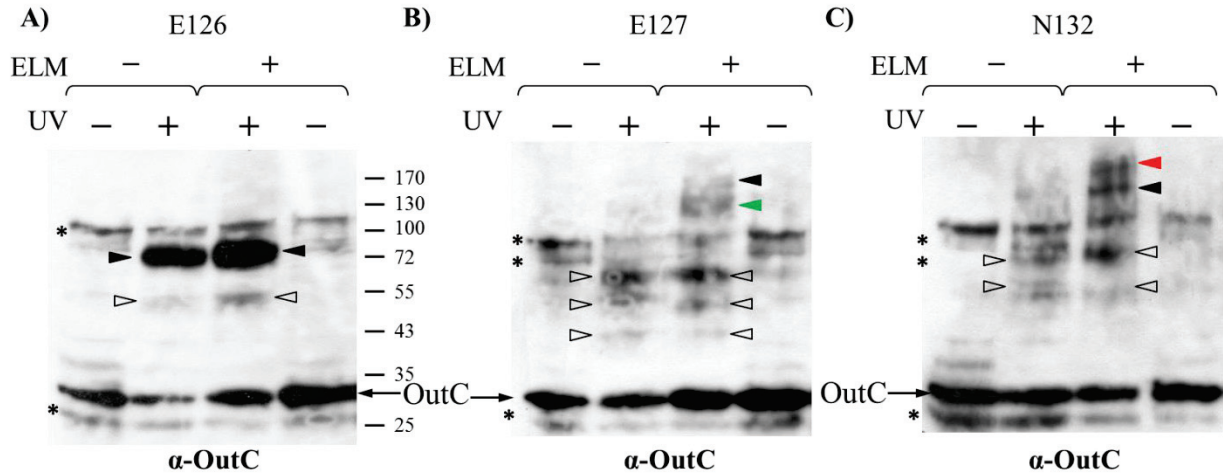


Figure 52. Effet d'OutE, OutL et OutM sur la formation de complexes par les variants d'OutC E126, E127 et N132

Le pontage dirigé avec les variants OutC E126pBpa, OutC E127pBpa et OutC N132pBpa a été réalisé chez *E. coli* MC4100 soit en présence de composants OutE, OutL et OutM (ELM +) soit en leur absence (ELM -). Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles indiquées dans Figure 49 et analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre OutC. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles et les bandes non-spécifiques, avec les étoiles.

La présence de composants OutE, OutL et OutM augmente la quantité de la protéine OutC E126pBpa et du complexe formé, mais elle ne change pas le profil général (Figure 52A). Par contre, dans le cas de OutC E127pBpa, la présence de ces composants change le profil de complexes formés : quelques complexes d'une taille d'environ 120 à 140 kDa sont générés en plus dans ces conditions (Figure 52B, triangles noirs, rouge et vert). Par contre, l'abondance de quelques bandes observés dans la zone de 40 à 65 kDa ne varie pas (Figure 52B, triangles blancs). Ainsi, ces résultats (Figures 51B et 52B) indiquent la formation d'un complexe spécifique entre OutC E127pBpa et OutL (Figure 52B, triangle vert), ce qui suggère une interaction du linker du domaine HR d'OutC avec OutL.

On peut également constater qu'en absence des composants OutE, OutL et OutM, le complexe entre OutC N132pBpa et OutD n'a plus été observé (Figure 52C, triangle rouge). Un tel complexe n'a donc été formé qu'en présence d'OutE, OutL et OutM (Figures 50A et B). Il est possible que la présence de ces composants permette une orientation particulière du linker du domaine HR le rapprochant d'un des domaines de la sécrétine OutD.

Afin de mieux comprendre les modalités de formations de tous ces complexes et estimer leur pertinence biologique, j'ai également testé l'effet de la présence d'une protéine sécrétée sur leur formation. Pour cela, la pectate lyase PelB a été co-exprimée en plus chez *E. coli* MC4100 avec les variants OutC E126pBpa, OutC E127pBpa et OutC N132pBpa et avec OutD, E, L, M. Cependant, nous n'avons observé aucun effet sur la formation de complexes par ces variants d'OutC (résultats non présentés).

En conclusion, les résultats du pontage dirigé du linker situé dans le domaine HR m'ont permis de proposer le modèle suivant (Figure 53).

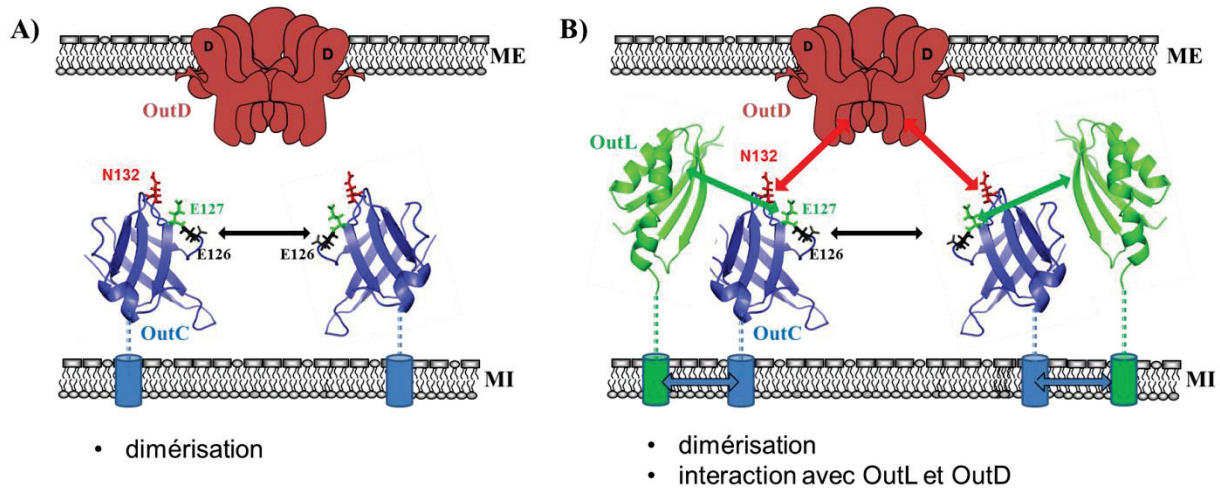


Figure 53. Représentations schématiques des interactions détectées chez *E. coli* grâce à l'incorporation de pBpa dans le linker du domaine HR d'OutC.

OutC (en bleu) est présentée sans domaine PDZ et OutL (en vert) est présentée sans sa région cytoplasmique. Le résidu E126 est indiqué en rouge, les résidus E127 et N132 sont en jaune. Les flèches représentent les interactions suggérées par cette étude. MI : la membrane interne.

IV.2.2. Pontage dirigé *in vivo* de brins- β du domaine HR d'OutC.

Des études précédentes ont démontré que le domaine HR serait impliqué dans de nombreuses interactions avec la sécrétine OutD (Korotkov *et al.*, 2006; Login *et al.*, 2010 ; Douzi *et al.*, 2011; Korotkov *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2012). Notamment, trois zones d'interactions potentielles ont été suggérées par ces études : la première, entre les brins $\beta 6$ et $\beta 7$ d'HR et deux régions distinctes d'OutD, situées dans les domaines N0 et N2-N3, respectivement (Login *et al.*, 2010) et les deux autres interfaces incluant le même site d'HR (le brin $\beta 1$) mais soit le brin $\beta 1$, soit le brin $\beta 3$ du domaine N0 d'OutD (Korotkov *et al.*, 2011 et Gu *et al.*, 2012 respectivement). Toutes ces interfaces entre le domaine HR d'OutC et la sécrétine OutD ont été démontrées *in vitro*, par pull-down, cristallographie et RMN, respectivement.

Afin de tester la pertinence biologique de ces interactions et d'établir l'organisation des domaines périplasmiques d'OutC et OutD au sein du système fonctionnel, une étude systématique utilisant le pontage disulfure *in vivo* a été initiée au laboratoire (Wang *et al.*, 2012). J'ai participé à une partie de cette étude concernant le domaine HR. Par ailleurs, j'ai aussi appliqué le pontage dirigé *in vivo* afin de tester certaines de ces interactions potentielles par cette technique. Les résidus suivants du domaine HR ont été choisis pour cette étude : G99, V100 et M101 (brin $\beta 1$), V143, V144 et L145 (brin $\beta 6$) et V153 et L154 (brin $\beta 7$) (Figure 54).

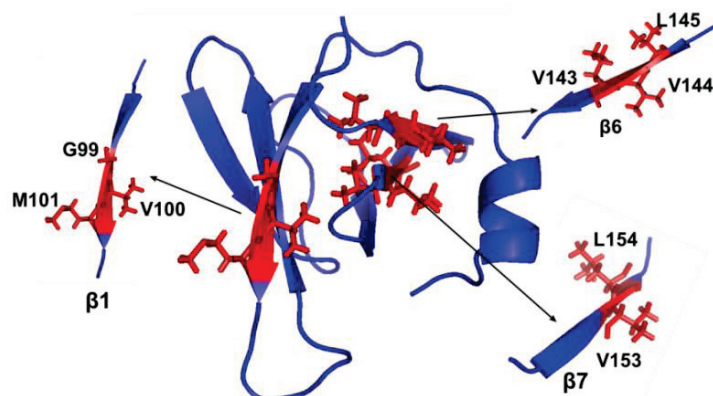


Figure 54. Résidus du domaine HR d'OutC sélectionnés pour l'incorporation du pBpa.

La structure du domaine HR est présentée en bleu, les résidus sélectionnés sont présentés en rouge.

Tout d'abord, la production de ces variants a été testée en présence et en absence du pBpa chez *E. coli* MC4100 (Figure 55). Les variants portant les substitutions à la place de résidus G99, V100 et M101 dans le brin $\beta 1$ ont été moins bien produits que les substitutions dans le brin $\beta 6$ (V143, V144 et L145) et le brin $\beta 7$ (V153). De plus, le variant L154 n'a pas été produit. Comme ce résidu est orienté à l'intérieur du feuillet $\beta 2$ (Figure 54), il est possible que l'incorporation du

pBpa qui possède une longue chaîne latérale à la place de la leucine puisse fortement déstabiliser le cœur hydrophobe du domaine HR (Gu *et al.*, 2012).

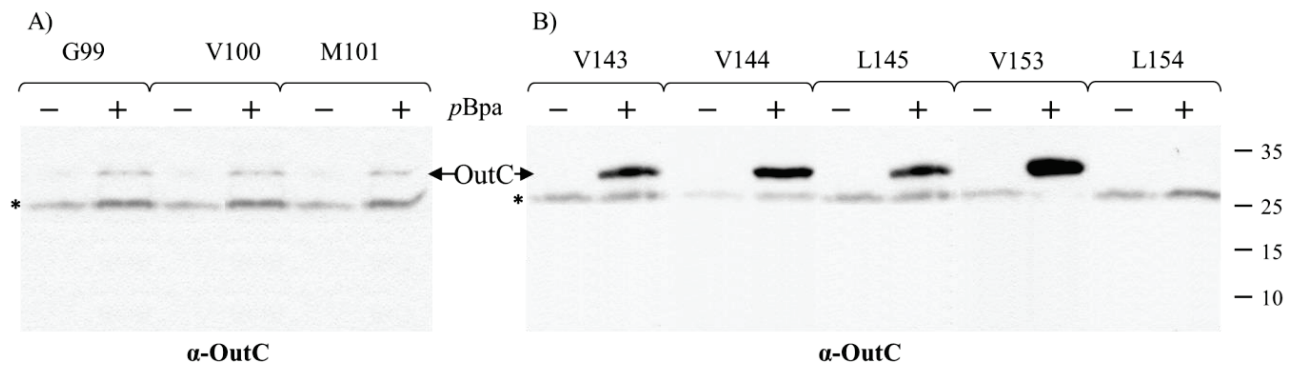


Figure 55. Efficacité de l'incorporation du *pBpa* dans le domaine HR.

Les cellules d'*E. coli* MC4100 ont été transformées avec deux plasmides, pSup-BpaRS-6TRN et pTdB-PLI-oC_{TAG}DS. Le résidu d'OutC substitué dans ce dernier plasmide est indiqué en haut. Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles indiquées dans Figure 12 en absence (-) ou en présence (+) de *pBpa* 1mM et analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre OutC. La position d'OutC est indiquée avec une flèche, la bande non-spécifique, avec une étoile.

Même si les substitutions situées dans le brin $\beta 1$ ont été produites en une quantité plus faible que les autres variants (Figure 55 comparer A et B), aucune translecture traductionnelle n'a été observée indiquant l'incorporation efficace du *pBpa* dans tous les variants à l'exception du L154 (Figure 55). Pour le pontage dirigé, tous ces variants ont été co-exprimés avec OutD, OutS et les composants de la membrane interne OutL et OutM et l'ATPase OutE chez *E. coli* MC4100 (Figure 56).

Aucun complexe n'a été détecté avec les variants d'OutC portant le *pBpa* à la place de résidus situés dans les brins $\beta 6$ et $\beta 7$ (Figure 56, panel droite). Par contre, quelques complexes similaires ont été générés par les variants G99 et M101 (le brin $\beta 1$) (Figure 56, panel gauche). Les chaînes latérales de ces deux résidus sont orientées de même côté du brin $\beta 1$ mais opposée à celle du résidu adjacent V100 qui ne forme aucun complexe. On peut constater que l'efficacité de pontage par le variant M101 est plus forte que celle par G99 ce qui peut suggérer une meilleure proximité de ce résidu avec ses partenaires.

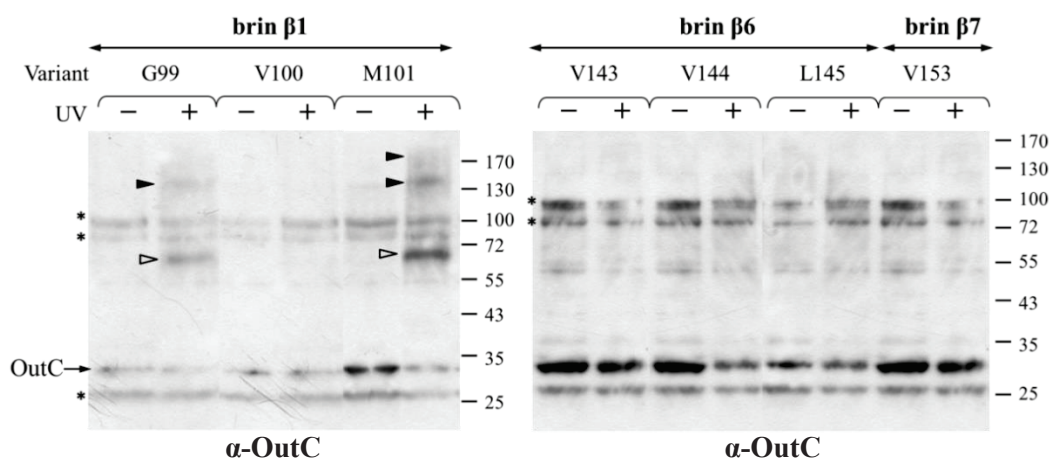


Figure 56. Pontage dirigé ciblant les brins β du domaine HR d'OutC.

Les cellules d'*E. coli* MC4100 ont été transformées avec des plasmides, pSup-BpaRS-6TRN pBAD:ELM et pTdB-PLI-oC_{TAG}DS. Le résidu d'OutC substitué dans ce dernier plasmide est indiqué en haut. Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles indiquées dans Figure 12. Les cellules ont été ensuite prélevées et exposées aux UV pendant 3 min (+) ou non (-) et analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre OutC. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles. La position d'OutC est indiquée avec une flèche, les bandes non-spécifiques, avec les étoiles.

Afin de déterminer la nature des complexes formés par OutCM101pBpa, ces échantillons ont été analysés avec les anticorps dirigés contre OutD, OutL et OutM (Figure 57 et non montré). Le complexe ayant un poids apparent de 140 kDa interagit aussi avec des anticorps dirigés contre OutD ce qui indique que le brin β 1 du domaine HR interagit *in vivo* avec la sécrétine OutD (Figure 57). Par contre, aucun complexe spécifique n'a été détecté avec des anticorps dirigés contre OutL et OutM (non montré). Il est donc possible que l'autre complexe abondant généré par OutCM101pBpa (~70 kDa) soit un l'homodimère d'OutC ou un complexe avec une protéine d'*E. coli*.

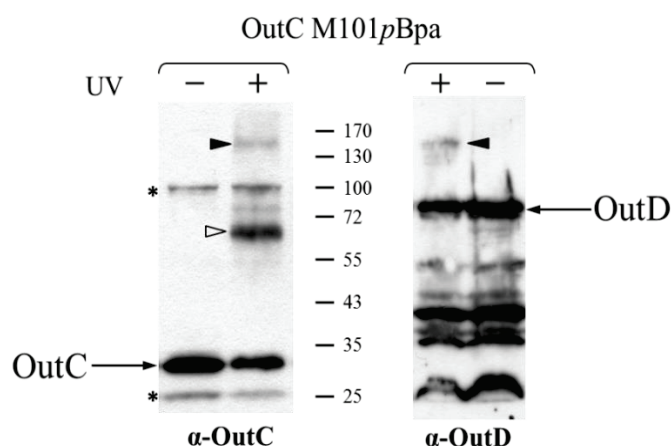


Figure 57. Pontage dirigé du variant OutC M101pBpa chez *E.coli* MC4100.

Les échantillons issus du pontage dirigé d'OutC M101pBpa présentés sur la Figure 56 ont été analysés en parallèle avec des anticorps dirigés contre OutC (panel gauche) et OutD (panel droite). Les positions de protéines OutC et OutD sont indiquées avec les flèches, les complexes formés avec les triangles, les bandes non spécifiques avec les étoiles.

Pour analyser plus en détail la nature et les conditions de formation des complexes par le variant OutC M101pBpa, nous avons testé l'influence d'une protéine sécrétée, la pectate lyase PelB (Figure 58). Dans ces expériences, le variant OutC M101pBpa a été co-exprimé avec les composants OutE, OutL et OutM (pBAD:ELM), OutD et OutS soit avec PelB (pTPLB- oC_{M101TAG}DS) soit sans (pTdB- oC_{M101TAG}DS).

Nous avons pu constater que la présence de la pectate lyase PelB, affecte fortement la dimérisation d'OutC via le brin β 1 et aussi l'interaction de ce même brin β 1 avec la sécrétine OutD. Effectivement, en présence de PelB la quantité de complexes respectifs (~70 kDa) est très faible voir nulle (Figure 58, triangles blancs et noirs respectivement).

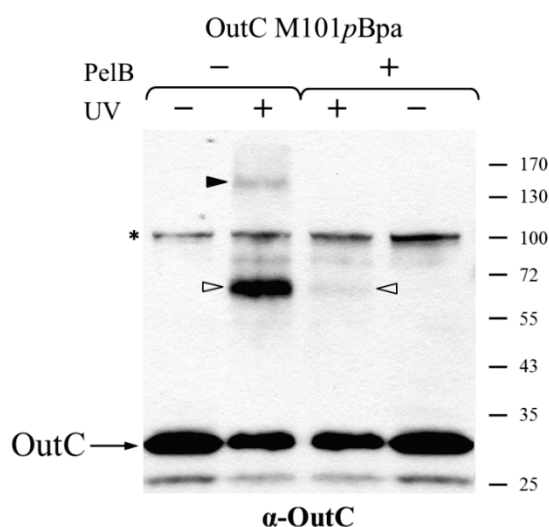


Figure 58. Effet de la pectate lyase PelB sur la formation du complexe par OutCM101pBpa.

Les cellules d'*E. coli* MC4100 ont été transformées avec les trois plasmides : pSup-BpaRS-6TRN, pBAD:ELM et soit pTdB- oC_{M101TAG}DS (PelB -) soit pTPLB- oC_{M101TAG}DS (PelB +). Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles indiquées dans Figure 12. Les cellules ont été ensuite prélevées et exposées aux UV pendant 3 min (+) ou non (-) et analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre OutC. Les complexes formés sont indiqués avec les triangles. La position d'OutC est indiquée avec une flèche, la bande non-spécifique, avec une étoile.

Ces études indiquent que la protéine sécrétée affecte l'organisation des domaines HR adjacents et empêche, directement ou non, leur contact via les brins β 1. Ces résultats sont aussi compatibles avec ceux réalisés par le pontage disulfure *in vivo* (Wang *et al.*, 2012) illustrés dans la Figure 59. Particulièrement, ces expériences ont aussi démontré que l'homodimérisation du domaine HR via le brin β 1 est renforcée par les composants de membrane interne OutE/L/M mais diminuée en présence de la protéine sécrétée PelB. Par ailleurs, cette étude par pontage disulfure a montré que le brin β 1 d'HR (G99) interagit *in vivo* avec le brin β 1 du domaine N0 d'OutD (F34). Ce dernier résultat serait notamment compatible avec la formation d'un complexe

OutC-OutD observée dans les expériences de pontage-UV dirigé avec le variant OutCM101pBpa (Figures 57 et 58).

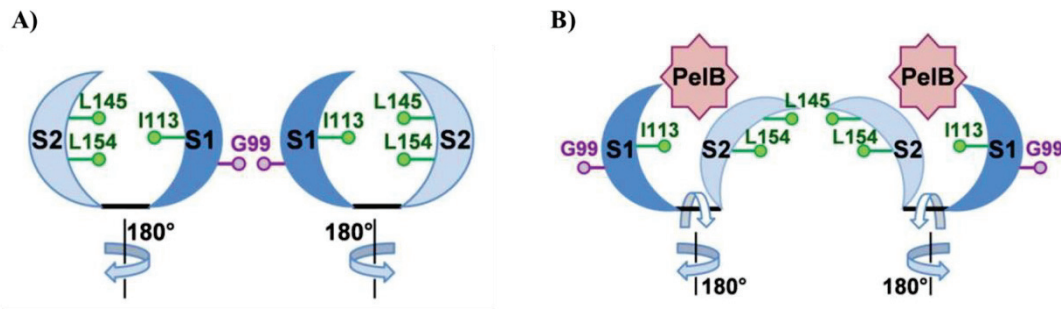


Figure 59. Effet de la pectate lyase PelB sur l'organisation des domaines HR.

A) En absence de PelB les domaines HR interagissent par les feuillets $\beta 1$ (S1, β -sheet 1) : une interface se forme entre les brins $\beta 1$ (G99/ G99). B) La présence de PelB empêche les contacts via les brins $\beta 1$ et favorise l'interaction entre deux feuillets $\beta 2$ (S2, β -sheet 2) via les brins $\beta 6$ et $\beta 7$ (L145 et L154) (Wang *et al.*, 2012).

Dans le but d'analyser ces interactions au sein d'un système de sécrétion fonctionnel, le pontage dirigé a été effectué dans une souche de *D. dadantii* $\Delta outC$ (Figure 60). Dans ces expériences, les variants d'OutC d'intérêt ont été co-exprimés avec OutD, OutS et PelB (pTPLB- oC_{M101TAG}DS). On peut constater que le variant OutC M101pBpa génère plusieurs complexes, parmi lesquels, deux interagissent aussi avec des anticorps dirigés contre OutD. Ceci peut suggérer que le domaine HR peut interagir avec deux sites d'OutD différents et les complexes ainsi formés peuvent migrer différemment. Sinon, il n'est pas exclu que le complexe ayant le poids apparent plus grand soit dégradé partiellement. De plus, nous avons détecté trois bandes de poids moléculaires d'environ 110kDa, 60kDa et 50 kDa (Figure 60A triangles blancs) qui sont apparemment toutes différentes du complexe d'une taille d'environ 70kDa observé chez *E. coli* MC4100 (Figure 58).

Puisque nous avons constaté que la pectate lyase PelB affecte la formation des complexes par le variant OutC M101pBpa chez *E. coli*, pour cela cette protéine doit se retrouver proche du brin $\beta 1$ du domaine HR ou affecter l'arrangement des domaines HR adjacents en espaçant leurs feuillets β . Il est donc possible qu'un des complexes observés chez *D. dadantii* soit formé à cause d'interaction directe entre OutC et PelB. Cependant, l'analyse des mêmes échantillons avec les anticorps dirigés contre PelB n'a pas donné une réponse positive (non montré). Il est possible que chez *D. dadantii* le complexe puisse être formé entre ce brin $\beta 1$ et une autre protéine à sécréter ou un composant du système. Ces résultats sont très prometteurs, mais par

manque de temps, je n'ai pas pu les exploiter et la nature exacte de ces complexes reste à déterminer.

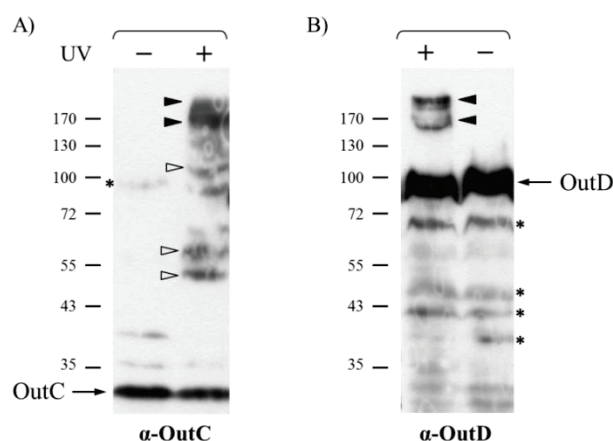


Figure 60. Pontage dirigé du variant OutC M101pBpa chez *D. dadantii* $\Delta outC$ A3556.

Les cellules de *D. dadantii* $\Delta outC$ A3556 ont été transformées avec pSup-BpaRS-6TRN et pTPLB- oC_{M101TAG}DS (PelB+, OutC+, OutD+, OutS+). Les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles indiquées dans Figure 13. Les cellules ont été ensuite prélevées et exposées aux UV pendant 3 min (+) ou non (-) et analysées par immunodétection avec des anticorps dirigés contre OutC (panel gauche) et OutD (panel droite). Les positions de protéines OutC et OutD sont indiquées avec les flèches, les complexes formés, avec les triangles, les bandes non spécifiques, avec les étoiles.

En conclusion, le pontage dirigé *in vivo* nous a permis de démontrer l'implication du brin $\beta 1$ du domaine HR dans la dimérisation d'OutC et l'interaction avec la sécrétine OutD. La présence d'une protéine sécrétée PelB affecte ces interactions chez *E. coli*. Chez *D. dadantii*, cette région peut aussi être impliquée dans l'interaction avec un autre partenaire(s).

Cependant, aucune interaction impliquant les brins $\beta 6$ et $\beta 7$ du domaine HR d'OutC n'a été détectée par cette technique. Il n'est pas exclu que l'arrangement et la distance nécessaires au pontage n'aient pas été acquises. Afin d'analyser l'implication de ces deux sites d'HR dans les interactions potentielles avec la sécrétine OutD nous avons décidé d'utiliser le pontage disulfure *in vivo*. Cette technique peut détecter les interactions entre deux protéines avec la proximité de 6-8 Å contre 4 Å dans le pontage avec le pBpa.

Ensemble ces résultats nous a permis de démontrer multiples interactions entre les domaines périplasmiques d'OutC et OutD : 1) $\beta 1^{HR} - \beta 1^{N0}$, 2) $\beta 7^{HR} - \beta 2^{N0}$, et 3) $\beta 7^{HR} - \beta 10^{N2}$, présentés schématiquement sur la Figure 61. Plus de détails de cette étude sont présentées dans l'article de Wang *et al.*, 2012 (Figure S6). Ensemble de ces études nous a permis de démontré non seulement la formation de multiples complexes impliquant des domaines périplasmiques d'OutC et d'OutD mais également de montrer la dynamique de leurs assemblages et des modifications de leurs organisations induites au cours de la sécrétion.

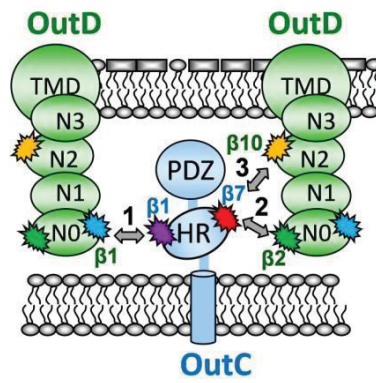


Figure 61. Représentation des interactions entre le domaine HR d'OutC et la sécrétine OutD.

A) Trois types d'interactions entre HR et OutD sont présentées avec les chiffres : 1) $\beta 1^{\text{HR}} - \beta 1^{\text{N0}}$; 2) $\beta 7^{\text{HR}} - \beta 2^{\text{N0}}$ et 3) $\beta 7^{\text{HR}} - \beta 10^{\text{N2}}$.

Discussion.

Le système de sécrétion de type II est largement exploité par les pathogènes des plantes et des animaux (*Vibrio*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Dickeya*, *Pectobacterium*, etc...) pour sécréter des toxines et des enzymes lytiques. Bien qu'il soit étudié chez de nombreuses bactéries, l'architecture et le mode de fonctionnement de ce système ne sont pas encore bien compris. Les protéines sécrétées par le T2SS n'ont pas de motif de sécrétion linéaire commun et en dépit de nombreuses tentatives pour comprendre les mécanismes de reconnaissance des protéines à sécréter, le signal de sécrétion n'a toujours pas été identifié. Des résultats antérieurs suggèrent que plusieurs zones structurées au sein d'une protéine repliée peuvent agir comme des signaux de sécrétion et sont probablement reconnues par un ou plusieurs composants du T2SS. Le mécanisme de la reconnaissance peut inclure plusieurs interactions transitoires avec plusieurs composants du système.

Le but principal de cette thèse était d'élucider comment le T2SS, une machinerie cellulaire complexe reconnaît et transporte des protéines repliées à travers la membrane externe. Pour atteindre cet objectif, j'ai tenté de caractériser le mécanisme moléculaire mise en jeu et en particulier, les éléments structuraux permettant à une protéine d'être reconnue par le T2SS et d'identifier les composants du T2SS impliqués dans la reconnaissance de ce signal.

Afin de pouvoir capter les interactions transitoires au cours de processus de sécrétion, une technique de pontage dirigé *in vivo* a été mise au point et utilisée chez *E. coli* et *D. dadantii*. Cette technique consiste à insérer *in vivo* l'analogue photoréactif d'acides aminés, le *pBpa*, à la place d'un résidu présumé constituer ou faire partie du signal de sécrétion. Le pontage UV réalisé lors du processus de la sécrétion va permettre de coupler la protéine d'intérêt avec ses partenaires. Cette technique semble donc être bien adaptée à la recherche des interactions transitoires au cours de la sécrétion. Elle permet aussi d'analyser le phénomène de reconnaissance des deux côtés, en insérant le *pBpa* dans le substrat et dans les composants du T2SS.

Une partie de mon travail a été consacrée à la mise au point de la technique de pontage dirigé *in vivo*. J'ai choisi les meilleures conditions et paramètres permettant sa mise en œuvre chez *E. coli* et *D. dadantii*. Chez cette dernière bactérie, j'ai pu notamment réaliser le pontage lors d'une sécrétion active, ce qui a dû limiter la formation de complexes non spécifiques. Ce travail m'a permis de démontrer que l'efficacité de l'incorporation du *pBpa* et du pontage UV dépend de plusieurs facteurs et qu'*à priori* il est impossible de prédire ces résultats. L'utilisation des données structurales, couplée à des modélisations *in silico*, ne se sont pas montrés très efficaces

non plus pour choisir les bonnes positions pour l'insertion du *pBpa*. En effet, une meilleure manière de procéder reste une approche systématique, c'est à dire à substituer par le *pBpa* plusieurs résidus à la suite. Par ailleurs, outre son intérêt dans le cadre de cette étude, cette technique peut être maintenant utilisée plus largement par les membres de l'équipe pour tester *in vivo* l'implication d'une région (et plus précisément un résidu sélectionné) de la protéine d'intérêt dans l'interaction avec son partenaire présumé.

Cette étude a ciblé trois axes principaux : i) caractériser les éléments structuraux permettant à une protéine d'être reconnue par le T2SS et identifier les composants du système impliqués dans la reconnaissance de ces motifs ; ii) caractériser les sites et les résidus du composant OutC engagés dans des interactions avec le substrat et avec d'autres composants et iii) approfondir la connaissance générale de l'architecture et du mode de fonctionnement du T2SS.

Notre modèle d'étude est le T2SS d'une bactérie phytopathogène *D. dadantii*, appelé Out. Ce système assure la sécrétion de nombreuses protéines, y compris douze pectinases et une cellulase (Chapitre VIII.5.1., p. 115). J'ai utilisé comme modèle d'étude une de ces protéines, la pectate lyase PelI. PelI possède deux domaines : Fn3 et le domaine catalytique. L'intérêt de cette protéine modèle est renforcé par le fait qu'une bactérie proche, *P. carotovorum*, possède la pectate lyase Pel3, homologue de PelI. Bien que ces deux protéines possèdent 67 % d'identité, la pectate lyase Pel3 ne pas sécrétée par le système Out de *D. dadantii*. Ce phénomène démontre clairement la spécificité très fine de reconnaissance et de recrutement des substrats par le T2SS. Par ailleurs, la disponibilité des données structurales sur ces deux pectate lyases homologues, nous a permis d'avoir une stratégie rationnelle pour mener à bien le pontage dirigé *in vivo*.

Nous nous sommes intéressés, en particulier, à la question suivante : comment le système Out peut reconnaître la différence entre ces deux pectate lyases très similaires ? Nous avons donc cherché quels sont des éléments structuraux de PelI et Pel3 qui peuvent potentiellement jouer un rôle des signaux de sécrétion spécifiques d'espèce. Tout d'abord, l'échange de domaines entre PelI et Pel3 a démontré que la majorité de l'information différente entre les deux pectate lyases est localisée au sein du domaine Fn3 (Pineau *et al.*, 2014, Figure 2B, p. 225). Ensuite, la construction de protéines hybrides plus fines et la mutagenèse dirigée ont permis d'identifier une région particulière au sein du domaine Fn3 appelé la boucle 3 qui peut constituer ou faire partie du motif de sécrétion.

Le pontage dirigé *in vivo* de cette boucle 3 m'a permis d'identifier un résidu, D58, qui est directement impliqué dans l'interaction avec deux composants du système, OutC et OutD. J'ai également démontré que c'est le domaine PDZ d'OutC qui interagit avec la boucle 3.

L'interaction de cette boucle avec la sécrétine OutD a été confirmée par spectrométrie de masse. Notamment, cette analyse a permis de démontrer que ces deux protéines forment le complexe d'une taille apparente d'environ 140kDa. Par contre, nous n'avons pas pu déterminer la région exacte d'OutD qui interagit avec la boucle 3 de PelI. En effet, pour identifier la région d'OutD couplée par une liaison covalente avec le peptide de PelI qui contient le *pBpa*, il faut soit rechercher les masses de tous les peptides possibles qui seront générés par le pontage UV entre OutD et PelI marquée, soit pouvoir détecter tous les peptides d'OutD sauf un, qui est impliqué dans l'interaction. Il est évident qu'une telle analyse nécessite la présence d'une quantité importante du matériel. Nous avons été confrontés à deux difficultés : une faible quantité de complexes formés et leur dégradation. Il a été donc difficile de dépasser ces limites, car pendant le processus de sécrétion le temps d'interaction entre le substrat et chacun des composants du système est limité aussi que le temps de pontage (exposition des cellules aux UV). Par ailleurs, l'instabilité de complexes peut être liée à la nature des régions protéiques impliquées dans ces interactions car les zones non structurées sont plus exposées et plus sensibles aux protéases. De plus, nous n'avons pas pu surproduire les complexes d'intérêt chez *E. coli*, car les interactions spécifiques entre la protéine sécrétée et les composants du système n'ont pas pu être reproduites en absence d'un système de sécrétion fonctionnel chez cette bactérie. En conclusion, le pontage dirigé *in vivo* s'est avéré assez efficace pour tester l'implication possible d'un résidu précis d'une protéine d'intérêt dans l'interaction avec son partenaire présumé. Par la suite, la spectrométrie de masse serait assez efficace pour identifier ce partenaire. Cependant, cette technique a démontré ces limites pour pouvoir déterminer la région exacte de la protéine partenaire impliquée dans cette interaction.

Dans une approche plus systématique, j'ai également procédé au pontage dirigé *in vivo* d'autres régions non structurées du domaine Fn3 de PelI ainsi que quelques brins β . Ce criblage, même s'il n'est pas exhaustif a suggéré que la boucle 3 serait la seule région au sein du domaine Fn3 impliquée dans l'interaction avec les composants OutC et OutD. Or, il faut rester prudent car ma pratique de l'utilisation du pontage dirigé a démontré qu'à un résidu prêt on peut manquer des complexes. Par exemple, la substitution de D58 est la seule parmi sept testées dans la boucle 3 qui a généré massivement des complexes d'intérêt.

L'utilisation du pontage dirigé *in vivo* m'a permis également de démontrer que le linker qui connecte les deux domaines de PelI n'est pas une simple liaison, car il est directement impliqué dans l'interaction avec la sécrétine OutD.

L'analyse du domaine catalytique a été moins exhaustive et a été limitée à trois régions non structurées. J'ai démontré que parmi les régions testées, la boucle B du domaine catalytique de PelI (résidus K221 et D223) est impliquée dans l'interaction avec OutC.

Ainsi, l'utilisation du pontage dirigé *in vivo* m'a permis d'identifier quelques régions de PelI importantes pour la reconnaissance et prise en charge par le système Out. Tout d'abord, cette étude a démontré le rôle majeur de la boucle 3 du domaine Fn3. Cette région est impliquée dans l'interaction avec le domaine PDZ d'OutC et la sécrétine OutD. Par ailleurs, la région-linker entre les deux domaines de PelI interagit aussi avec OutD et une région au sein du domaine catalytique de PelI (boucle B) interagit avec OutC. Malheureusement, par manque du temps, je n'ai pas pu déterminer si le domaine PDZ est directement impliqué dans cette dernière interaction. Cependant, il semble évident que deux sites distants, situés sur les côtés opposés de PelI, la boucle 3 de Fn3 et la boucle B du domaine catalytique, sont pris en charge par le même composant, OutC (Figure 33). Ces résultats sont cohérents avec l'étude récente réalisée au laboratoire, qui a suggéré que pour être sécrétée, PelI a besoin d'une présence simultanée de deux domaines PDZ : un domaine PDZ interagirait avec la boucle 3 et un autre domaine PDZ interagirait avec un site situé dans le domaine catalytique (Pineau *et al.*, 2014).

D'autre part, la boucle 3 est aussi impliquée dans l'interaction avec la sécrétine OutD. Mes résultats préliminaires suggèrent une certaine coopérativité entre cette interaction et celle avec PDZ. Notamment, en présence du domaine PDZ-H23 non fonctionnel, le variant PelI D58 *pBpa* n'a plus généré de complexes avec OutC ni OutD (Figure 19). Ce résultat, à confirmer, est cohérent avec les données de double hybride montrant que l'interaction Fn3-PDZ est renforcée en présence du domaine N1 d'OutD (Pineau *et al.*, 2014).

Par ailleurs, j'ai démontré que le linker entre les deux domaines de PelI interagit aussi avec OutD. Sur la structure de Pel3 ce linker est situé à la proximité de la boucle 3, en formant ensemble une espèce de poche (Figure 28). On peut donc supposer que ces deux éléments peuvent agir ensemble lors de recrutement de PelI par la sécrétine. En général, l'interaction entre la sécrétine OutD et les protéines sécrétées semble être très forte. En effet, lors de l'immunoprécipitation des complexes pour l'analyse par spectrométrie de masse, j'ai observé systématiquement une co-immunoprécipitation massive d'OutD non cross-linkée avec PelI (Figure 22).

Ensemble, ces données permettent d'imaginer que la pectate lyase PelI lors de sa reconnaissance et de son recrutement rentre en contact plus ou moins simultané avec au moins deux composants de T2SS, OutC et OutD. Deux domaines PDZ vont réagir avec deux régions de

PelI, la boucle 3 du domaine Fn3 et la boucle B du domaine catalytique. En même temps, la protéine PelI sera positionnée d'une façon permettant l'interaction de deux motifs, la boucle 3 et le linker, avec la sécrétine OutD. Ces données montrent clairement la complexité du mécanisme de la reconnaissance et de la prise en charge qui nécessite la présence de plusieurs motifs au sein d'une protéine sécrétée qui vont interagir simultanément avec plusieurs domaines de composants du système. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer le rôle exact de ces motifs et le mécanisme de l'interaction. Notamment, une étude structurale a été initiée au laboratoire pour déterminer la structure cristalline d'un complexe formé entre les domaines Fn3 de PelI et N1 d'OutD.

De façon intéressante, le pontage dirigé sur les régions non-structurées de PelI a suggéré l'implication de deux autres partenaires potentiels à ce processus. En effet, deux complexes abondants d'une taille d'environ 50 kDa et 80kDa ont été fréquemment détectés lors du pontage dirigé chez *D. dadantii* ciblant des régions non structurées de PelI y compris la boucle 3 de Fn3 (Figures 15 et 25). Ceci suggère que deux protéines inconnues d'une taille d'environ 20 et 50 kDa peuvent être impliquées, directement ou non au processus de sécrétion. Il semble donc bien probable que PelI interagit avec un ou deux chaperons spécifiques qui peuvent faciliter son repliement ou sa prise en charge par le T2SS. Vu la taille estimée de ces deux partenaires potentiels, il pourrait s'agir de chaperons périplasmiques DegP (50 kDa) et Skp (17 kDa). Cependant, aucune de ces deux protéines n'a été détectée par la spectrométrie de masse. Par contre, cette analyse a suggéré l'implication de la protéine de la membrane externe OmpA dans la formation du complexe de 80 kDa avec PelI D58pBpa. OmpA possède le domaine périplasmique C-terminal de liaison au peptidoglycane. L'implication du peptidoglycane dans la mise en place et fonctionnement de la machinerie T2SS reste incertaine. Un couple GspA/GspB interagit avec le peptidoglycane et est nécessaire à l'assemblage de la sécrétine chez *Aeromonas* mais pas chez *Vibrio* (Strozen *et al.*, 2011). De plus, GspA/GspB ne sont pas présents dans la majorité des autres T2SS. Il serait envisageable que l'étape périplasmique de sécrétion par le T2SS sera liée directement ou non à OmpA et/ou au peptidoglycane. Cependant, il n'est pas exclu que l'interaction avec OmpA (si elle s'avérait être vraie) serait due à l'abondance de cette protéine. La nature exacte et le rôle de ces partenaires hypothétiques restent donc à déterminer. Il n'est pas exclu également que l'intervention éventuelle de tels chaperons serait conditionnée par la nature hydrophobe du pBpa et/ou par une expression relativement forte de PelI marquée. Il serait donc très intéressant de vérifier expérimentalement l'existence d'une telle étape préalable au recrutement des substrats par le T2SS.

Notre approche « côté substrat » a démontré l'interaction directe du domaine PDZ d'OutC avec un élément structural particulier de la protéine PelI (boucle 3). Pour identifier la région exacte du domaine PDZ impliquée dans cette interaction, j'ai utilisé une approche inverse, « côté système », en introduisant le *pBpa* dans quelques régions d'OutC, y compris le PDZ. Cette approche pourrait aussi permettre de démontrer une implication plus générale du domaine PDZ dans la reconnaissance d'autres substrats du système Out. Un mode d'interaction bien précis a été décrit pour les domaines PDZ chez eucaryotes qui consiste en la fixation d'un court peptide du substrat dans un site formé par les brins βA et βB et une hélice αB . Par contre, ce site est très divergent dans le PDZ de GspC et aucune interaction directe n'a été décrite pour le domaine PDZ de GspC. Mes premiers résultats sur ce domaine sont donc très encourageants.

D'un côté, ils suggèrent que le brin βA du domaine PDZ d'OutC serait impliqué dans l'interaction avec une protéine sécrétée, la pectate lyase PelB. Cependant, en utilisant cette approche, nous n'avons pas pu détecter une interaction avec la pectate lyase PelI. Il n'est pas exclu que les résidus de PDZ choisis pour cette étude ne soient pas bien positionnés pour une telle interaction. Ce travail va être poursuivi au laboratoire en ciblant un nombre plus important des résidus de PDZ à substituer par le *pBpa*.

D'un autre côté, les résultats du pontage dirigé du domaine PDZ d'OutC peuvent aussi suggérer que la protéine OutC pourrait se dimériser par l'interaction de domaines PDZ adjacents (via hélices αB). Même si la nature exacte de ces « homodimères » d'OutC reste à confirmer, une multimérisation possible via plusieurs domaines PDZ semble être très probable. Un phénomène similaire est bien décrit pour le chaperon périplasmique DegP, une des rares protéines bactériennes possédant des domaines PDZ (Ortega *et al.*, 2009). Mes résultats montrent que l'efficacité de dimérisation d'OutC est améliorée en présence de la protéine à sécréter et de la sécrétine OutD. La formation d'un tel dimère peut correspondre à un état fonctionnel d'OutC au cours de la sécrétion. Par exemple, ce type de dimérisation serait cohérent avec l'idée que deux domaines PDZ puissent interagir simultanément avec la pectate lyase PelI : un avec la boucle 3 du domaine Fn3 et un autre avec la boucle B du domaine catalytique (Pineau *et al.*, 2014).

Par ailleurs, indirectement, cette étude nous a permis de générer le substrat minimum du T2SS. En effet, nous avons observé la production de formes courtes de PelI portant les substitutions TAG de résidus Y218, K221 et D223 en absence du *pBpa* dans le milieu. Malgré l'absence d'une partie importante de la protéine (Figure 37), ces formes courtes de PelI restent stables et sont toujours prises en charge par le T2SS, et leur sécrétion dépend toujours du domaine PDZ. Par la suite, les mêmes variants ont été générés par l'introduction d'un codon TAA à la place de

mêmes résidus. Ces substrats « minimaux » présentent donc un modèle très attractif pour de futures études.

Ces études ont également permis d'éclaircir quelques autres aspects de l'organisation et du fonctionnement du système Out. Pour cela, le pontage dirigé a été utilisé pour chercher les interactions entre les composants du système. Notamment, cette technique a permis de démontrer l'implication directe du brin $\beta 1$ du domaine HR d'OutC dans son homodimérisation et l'interaction avec la sécrétine OutD. De plus, j'ai démontré que cette interaction est fortement affectée en présence d'une protéine sécrétée, PelB. Cependant, aucune interaction impliquant les brins $\beta 6$ et $\beta 7$ du domaine HR d'OutC n'a été détectée par cette technique. L'implication de ces deux sites d'HR dans les interactions avec la sécrétine OutD ont été démontrée par le pontage disulfure *in vivo* réalisé en parallèle (Wang *et al.*, 2012). Cette étude a suggéré trois interfaces d'interaction entre les domaines périplasmiques d'OutC et OutD : 1) $\beta 1^{HR} - \beta 1^{N0}$, 2) $\beta 7^{HR} - \beta 2^{N0}$, et 3) $\beta 7^{HR} - \beta 10^{N2}$. Le même élément structural, le brin $\beta 7$ serait donc impliqué dans l'interaction avec deux sites distincts d'OutD, $\beta 2^{N0}$ et $\beta 10^{N2}$, ce qui peut refléter le changement d'arrangements de domaines périplasmiques d'OutC et OutD au cours de la sécrétion (Wang *et al.*, 2012, voir la Figure S6). Ces résultats nous ont permis de démontrer non seulement la formation de multiples complexes impliquant des domaines périplasmiques d'OutC et d'OutD mais également de montrer la dynamique de leurs assemblages et des modifications de leurs organisations induites lors de la sécrétion.

Le pontage dirigé du linker situé entre les deux feuillets β du domain HR m'a permis de démontrer un rôle important de cette région. Ainsi, cette région serait impliquée dans l'homodimérisation d'HR (via le résidu E126), l'interaction avec la sécrétine OutD (via le résidu N132) et l'interaction avec le composant situé dans la membrane interne OutL (via le résidu E127) (Figure 53). Une interaction entre les domaines périplasmiques d'OutC et OutL n'a jamais été mise en évidence auparavant. En effet, cette interaction peut faire partie d'un réseau complexe d'interactions mises en jeu lors de la transmission du signal de la protéine OutC vers les autres composants de la membrane interne, OutL et OutM et l'ATPase OutE. Effectivement, nous avons récemment démontré que les domaines périplasmiques FLD de protéines OutL et OutM se trouvent dans une dynamique entre l'homo et l'hétérodimérisation (Lallemant *et al.*, 2013). De plus, leurs régions transmembranaires interagissent entre elles et avec celle d'OutC.

Il est possible d'imaginer un tel ordre d'interactions. Le domaine PDZ interagit avec une protéine à sécréter et ce signal est transmis au domaine HR qui ensuite interagirait avec les

domaines périplasmiques d'OutD permettant leur repositionnement nécessaire à l'entrée du substrat. Le domaine HR interagirait aussi avec le domaine FLD d'OutL. Cette interaction diminue l'homodimérisation de domaines FLDs d'OutL et favorise l'interaction du domaine FLD d'OutL avec le domaine FLD d'OutM. Ces changements sont ensuite transmis aux segments transmembranaires des protéines OutC, OutL et OutM qui forment un réseau d'interactions au sein de la membrane interne connecté à l'ATPase cytoplasmique.

Cette étude ouvre de nombreuses perspectives pour continuer la recherche sur les mécanismes de reconnaissance et de recrutement des protéines par le T2SS :

A) L'identification de la région exacte de la sécrétine OutD impliquée dans l'interaction avec la boucle 3 du domaine Fn3 de PelI.

B) L'identification de la région exacte de la sécrétine OutD impliquée dans l'interaction avec le linker situé entre deux domaines de PelI.

C) Il sera intéressant de vérifier si la boucle 3 et le linker situé entre les deux domaines de PelI peuvent interagir simultanément avec la sécrétine OutD.

D) L'identification de la région exacte de la protéine sécrétée PelB impliquée dans l'interaction avec le domaine PDZ d'OutC. On peut également élargir cette étude du domaine PDZ en faisant le pontage d'une zone plus large pour avoir plus d'information sur le site actif du PDZ et l'arrangement de différentes protéines sécrétées dans ce site.

E) Une étude structurale de l'interaction entre les domaines Fn3 et PDZ par co-cristallisation de ces domaines et par résonance magnétique nucléaire sont envisageables.

F) L'identification de la nature exacte d'autres partenaires de PelI suggérés par les expériences de pontage, notamment, de la protéine avec laquelle PelI interagit via les régions non structurées.

G) Peut-on appliquer les résultats obtenus sur PelI pour les autres protéines sécrétées par le système Out ou le T2SS en général ? Il est donc intéressant de chercher des motifs communs au sein des autres protéines secrétés par T2SS. Une telle analyse a été initiée lors de cette étude (Pineau *et al.*, 2014) et sera poursuivie.

E) Le rôle possible des autres composants du système n'a pas été profondément exploité dans cette étude, même si les complexes formés ont été analysés avec des anticorps dirigés contre OutL, OutM, OutG et OutK. Effectivement, des travaux récents suggèrent que certains autres composants vont aussi interagir avec les protéines lors de leur sécrétion.

Annexe I.

L'analyse par LC/MS-MS (Liquid chromatography–mass spectrometry) des complexes formés par le pontage UV a été réalisée en collaboration avec l'IBCP, CCMP, Spectrométrie de masse.

• Pell-D1

Pell

Accession	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	Score	Description
E0SM75	21,80	12	36,7	374,01	Endo-pectate lyase OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=pelI PE=4 SV=1 - [E0SM75_DICD3]

Couverture de séquence d'E0SM75 [PelI]

MFKYVIPLCA	LTLAAPSFAA	QTTLMLSQK	S	SDVNYLGWSTD	ESKVAR	QEVY	RGTTSNPDLR	ERIAVLDAET	RTFKDADTNS
GLNYWYWVDV	VSENQAQVVS	NAVTTAPNAG	PLRAAKASSE	CKPGATFENR	TVDCGGVTIG	TSCPNDSDKQ	KPLIILKNAT		
VKNLRISASG	GADGIHCDGS	NCTIENVIWE	DICEDAATNN	GKTMTIVGGI	AHNAKDGYGG	KPDKVLQHNS	KNSTTVVK	GN	
FTLTGEHGKL	WR	SCGDCSNN	GGPR	FLTVTS	ATVNGTIDSI	AGVNRNYGDV	ATISGLK	IKN	YKEGKPPVCE
STEKYGEKWD	TTNCKVSRSG	VSKL							EFKGVVKGQG

Fréquence peptides d'E0SM75 [PelI].

Peptides **	Nbre de spectres MSMS	IonScore max
FLTVTSATVNGTIDSIAGVNR	3	103
FLTVTSATVNGTIDSIAGVNRNYGDVATISGLK	3	60
IAVLDAETR	2	56
SDVNYLGWSTD	1	55
SDVNYLGWSTD	1	53
GNFTLTGEHGKLWR	1	47
ERIAVLDAETR	1	44

OutD

Accession	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	Score	Description
Q01565	8,87	10	76,2	246,46	Type II secretion system protein D OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=outD PE=1 SV=1 - [GSPD2_DICD3]

Couverture de séquence de Q01565 [OutD].

MLGKGIKSW	GWLGLTVLLL	GSPCGWAAEF	SASFSGTDIQ	EFINTVSKNL	NKTVIDPTV	RGTSVRSYD	MMNEGQYYQF
FLSVLDVYGF	SVVPMDNGL	KVIRSKDAK	S	SSSIPLANNEQ	PGIGDELVTR	VVPLNNVAAR	DLAPLLR
YEPSNVLLMT	GR	AAVIKRLV	DIVNTVDKGT	DREMVTVPLT	YASAEDVAKL	VNDLNKSDEK	NALPSTMLAN
VVSGEENARQ	RAVEMIRQLD	RKQVVQGGTK	VIYLYAK	AL	DLIEVLAGNG	TSGNR	NSSSS
GSSGSSSGSS	SSSSSSSMG	FGSAFGSTSS	SGGRTITIQG	KEVTVRAHDQ	TNSLIITAPP	DIMRDLEQVI	NQLDIRRPQV
LVEAIIAEIQ	DADGLNLGIQ	WANKRAGMTQ	FTNTGIPIST	AVIGTDQFRS	NGTLTTAYAS	ALSSFNGVTA	GFYRGWNSML
LTALSSDSKN	DVLATPSIVT	LDNMEATFNV	GQEVPLTGS	QTTSADNIFN	TVERKTVGIK	LRVKPQINEG	DSVLLQIEQE
VSSVADSNSS	TNSSLGVTFN	TRTVNNAMV	TNGETVVVGG	LLDKTSVESN	DKVPLLGDIP	WLGSLFRSKS	QEVKRKNLML
FLRPTIIRDP	GQFQEASINK	YRSFNNEQQQ	QRGEGNGVLD	NNTLRLSGGN	TYTFRQVQSS	ISDFYKPEGR	

Fréquence peptides de Q01565 [OutD]

Peptides**	Nbre de spectres MSMS	IonScore max
SSSIPLANNEQPGIGDELVTR	5	74
ALDLIEVLAGNGTSGNR	1	63
QLNDNAGAGTVVHYEPSNVLLMTGR	4	42

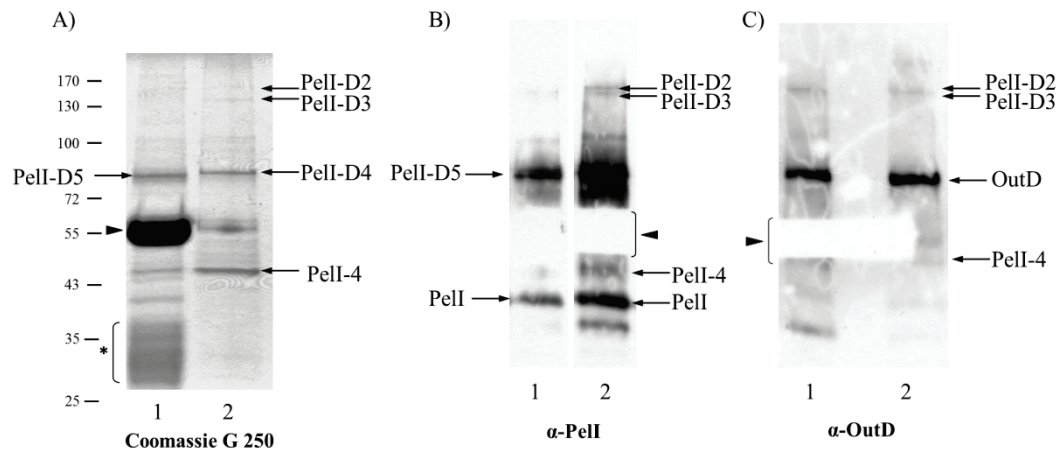


Figure 22. Immunoprécipitation de complexes formés par Pell D58pBpa (voir p. 140).

• Pell-D2. Pell.

Accession	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	Score	Description
E0SM75	13,66	4	36,7	146,00	Endo-pectate lyase OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=peII PE=4 SV=1 - [E0SM75_DICD3]

Couverture de séquence d'E0SM75 [Pell]

```

MFKYVIPLCA LTLAAPSFAA QTTMLLSQK S DVNYLGWSTD ESK VARQEVY RGTTSNPDLR ERIAVLDAET RTFKDADTNS
GLNYWYVVDV VSENQAQVVS NAVTTAPNAG PLRAAKASSE CKPGATFENR TVDCGVTIG TSCPNDSDKQ KPLIILKNAT
VKNLRISASG GADGIHCD SG NCTIENVIWE DICEAATNN GKTMTIVGGI AHNAKDGYGG KPDKVLQHNS KNSTTVVKGN
FTLTGEHGKL WRSCGDCSNN GGPR FLT VTS ATVNGTIDSI AGVNRNYGDV ATISGLK IKN YKEGKPPVCE EFKGVVKGQG
STEKYGEKWD TTNCKVSRSG VSKL

```

Fréquence peptides d'E0SM75 [Pell].

Peptides**	Nbre de spectres MSMS	IonScore max
FLTVTSATVNGTIDSIAGVNR	2	79
SDVNYLGWSTD ESK	1	52
NYGDVATISGLK	1	43

OutD

Accession	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	Score	Description
Q01565	32,39	24	76,2	1007,65	Type II secretion system protein D OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=outD PE=1 SV=1 - [GSPD2_DICD3]

Couverture de séquence de Q01565 [OutD].

```

MLGKGIKSW GWLGLTVLLL GSPCGWAAEF SASFK GTDIQ EFINTVSKNL NKTVIDPTV RGTISVRSYD MMNEGQYYQF
FLSVLDVYGF SVVPM DNGVL KVIRSKDAK S SSIPLANNEQ PGIGDELVTR VVPLNNVAAR DLAPLLR QLN DNAGAGTVVH
YEPSNVLLMT GR AAVIKRLV DIVNTVDK TG DREMTVPLT YASAEDVAKL VNDLNKSDEK NALPSTMLAN VVADGR TNSV
VVSGEENAR Q RAVEMIRQLD RKQVVQGGTK VIYLKYAK AL DLIEVL A GNG TSGNRNSSSS NASRPSSPRS GSSSNSNSSS
GSSGSSSSGSS SSSSSSSSMG FGSAFGSTSS SGGRTITI QG KEVTVRAHDQ TNSLIITAPP DIMR DLEQVI NQLDIR RPQV
LVEAIIAEIQ DADGLNLGIQ WANKR AGMTQ FTNTGIPIST AVIGTDQFRS NGTLTTAYAS ALSSFNGVTA GFYRGNWSML
LTALSSDSKN DVLATPSIVT LDNMEATFNV GQEVFPVL TGS QTTSADNIFN TVERKTVGIK LRVKPQINEG DSVLLQIEQE
VSSVADSNS TNSLGVTFN TR TVNNAVMV TNGETVVVG LLDK TSVESN DKVPLLGDIP WLGLSFRSKS QEVVRKNLML
FLRPTIIRDP GQFQEASINK YR SFNNEQQQ QRGEGNGVLD NNTLRLSGGN TYTFRQVQSS ISDFYKPEGR

```


Fréquence peptides de Q01565 [OutD].

Peptides**	Nbre de spectres MSMS	IonScore max
SNGLTITAYASALSSFNQVGTAGFYR	13	126
TVNNAMVMTNGETVVVGGLLDK	5	116
ALDLIEVLAGNGTSGNR	44	105
AGMTQFTNTGIPISTAVIGTDQFR	11	95
SSSIPLANNEQPGIGDELVTR	76	93
NALPSTMLANVVADGR	4	89
LSGGNTYTFR	91	84
SDEKNALPSTMLANVVADGR	1	84
QVQSSISDFYKPEGR	19	82
RLVDIVNTVDK	3	75
GTDIREFINTVSK	8	72
QLNDNAGAGTVVHYEPSNVLLMTGR	13	72
DLEQVINQLDIR	2	72
QVVQGGTKVIYLYK	4	72
TNSVVVSGEENAR	17	71
SFNNEQQQQRGEGNGVLDNNTLR	38	69
LVNDLNKSDEKNALPSTMLANVVADGR	11	69
NLNKTVIIDPTVR	4	67
SFNNEQQQQR	17	66
SKDAKSSSIPLANNEQPGIGDELVTR	1	65
DPGQFQEASINK	1	65
TITIQGKEVTVR	7	58
GNWSMLLTALSSDSK	1	58
LVDIVNTVDK	2	58
RLVDIVNTVDKTDGR	2	57
GEGNGVLDNNTLR	17	57
NALPSTMLANVVADGRNTNSVVVSGEENAR	3	57
LVDIVNTVDKTDGR	3	56
QLDRKQVVQGGTK	1	55
VVPLNNVAAR	26	55
NSSSSNASRPPSPR	1	51
GTDIREFINTVSKNLNK	3	50
RAGMTQFTNTGIPISTAVIGTDQFR	4	49
KQVVQGGTKVIYLYK	3	47
KTVGIKLR	3	47
TVIIDPTVR	2	46
TGDEMVTVPITYASAEDVAK	2	46
SGSSSNSNSSGSSGSSSSSSSSSSSMGFSAFGSTSSSGGR	1	45
EMVTVPITYASAEDVAK	2	43
TNSVVVSGEENARQR	1	42
LSGGNTYTFRQVQSSISDFYKPEGR	1	42
DPGQFQEASINKYR	1	39
QVVQGGTKVIYLYKAK	1	39

Pell.

Accession	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	Score	Description
E0SM75	27,33	15	36,7	418,78	Endo-pectate lyase OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=pell PE=4 SV=1 - [E0SM75_DICD3]

Couverture de séquence d'E0SM75 [Pell].

MFKYVIPLCA	LTLAAPSFAA	QTTLMLSQK	S	DVNYLGWSTD	ESKVAR	QEVY	RGTTSNPDLR	ER	IAVLDAET	R	TFKDADTNS
GLNYWYWVDV	VSENQAQVVS	NAVTTAPNAG	PLRAAK	ASSE	CKPGATFENR	TVDCGGVTIG	TSCPNDSDKQ	KPLIILKNAT			
VKNLRISASG	GADGIHCDSG	NCTIENVIWE	DICEDAATNN	GK	TMTIVGGI	AHNAK	DGYGG	KPDKVLQHNS	KNSTTVVK	GN	
FTLTGEHGKL	WRSCGDCSNN	GGPR	FLTVTS	ATVNGTIDSI	AGVNRNYGDV	ATISGLK	IKN	YKEGKPPVCE	EFKGVVKGQG		
STEKYGEKWD	TTNCKVSRSG	VSKL									

Fréquence peptides d'E0SM75 [Pell].

Peptides**	Nbre de spectres MSMS	IonScore max
FLTVTSATVNGTIDSIAGVNR	3	90
SDVNYLGWSTDESK	2	61
TMTIVGGIAHNAK	2	60
IAVLDAETR	6	52
FLTVTSATVNGTIDSIAGVNRNYGDVATISGLK	4	51
GNFTLTGEHGK	1	49
ASSECKPGATFENR	1	49
SDVNYLGWSTDESKVAR	2	44
NYGDVATISGLK	1	39

OmpA.

Accession	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	Score	Description
E0SN28	28,33	16	37,6	406,78	Outer membrane protein A (3a;II*;G;d) OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=ompA PE=3 SV=1 - [E0SN28_DICD3]

Couverture de séquence d'E0SM28 [OmpA].

MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ AAPNDNTWYA GAKLGWSQYH DTGLTGNGYN VTNAAQNLG AGAFGGYQVN PYLGFEMGYD
 WLGRMKYNGG NQGSFKAQGV QLSAKLSYPI VDDLDIYTRL GGFVSRDSDH DNSGLNDHDT GVSPLAAVGV EYAITKNWAT
 RLDYQWVNNI GDASTVGGRP DNGLLSVGVS YRFGQETAAP APVIAAPAPT PAPAPVVQTK RFTLKSDVLF NFNKATLKPE
 GQRSLDQLYS QLSTLDPKDG SVVVLGFTDR LGSDQYNQTL STKRAQTVVD YLVHKGIPAN KISARGMGKA NPVSGSTCTN
 VKARAALIDC LAPDRVEIE VKGIKDVVTQ PQA

FtsH

Accession	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	Score	Description
E0SKX4	49,92	51	70,8	1409,92	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=ftsH PE=3 SV=1 - [E0SKX4_DICD3]

• Pell-D4 (exp2) (Figure 23).

OutD.

Total	% Cov	Accession #	Name	Peptides(95%)
176,67	90,6	Q01565	Type II secretion system protein D OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=outD PE=1 SV=1	91

Couverture de séquence de Q01565 [OutD].

MLGKGIKKSXGWLGLTVLLLGSPCGWA AEFSASFSGTDIQEFINTVSKNLNKTVIDPTVRGTISVRSYDMMN
 EGQYYQFFLSVLDVYG FSVVPM DNGVLK VIRSKDAKSSSIPLANNEQPGIGDELVT RVVPLNNVAARDLAPLL
 RQLNDNAGAGTVVHYEPSNVLLMTGRAAVIK RLVDIVNTVDKTDG REMVTVP LTYASAEDVAKLVNDLNKSD
 KNALPSTMLANVVADGR TNSV VVS GEENARQRAVEMIRQLDRKQV VQGGTKVIYLYKAKALDLIEVL AGNGTS
 GNRNSSSSNASRPSSPRSGSSSNSNSSSGSSSGSSSSSSSSSSSSSSSMGF GSAFGSTSSSGGRTITIQGKEVT
 RAHDQTN SLITAPPDIMRDLEQVINQLDIRRPQVLVEAIIAEIQDADGLNLGIQWANKRAGMTQFTNTGIP
 STAVIGTDQFRSNGTLTTAYASALSSFNGVTAGFYRGNWSMLLTALSSDSKNDVLATPSIVTLDNMEATFNVG
 QEVVPLTGSQTTSADNIFNTVERKTVG IKIRVKPQINEGDSVL LQIEQEVSSVADSNSSTNSSLGVTFNTRTV
 NNAVMVTNGETV VVGGLDKTSVESNDKVP LLGDI PWLGSILFRSKSQEVRKRNLMLFLRPTIIRDPGQFQ
 INKYRSFNNEQQQQRGEGNGVLDNNTLRLSGGNTYTFRQVQSSISDFYKPEGR

Peptides verts : peptides identifiés avec une confiance > 95%

Peptides jaune : peptides identifiés avec une confiance > 50% et < 95%

Pell.

Total	% Cov	Accession #	Name	Peptides(95%)
7,63	38,1	E0SM75	Endo-pectate lyase OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=pell PE=4 SV=1	5

MFKYVIPLCALTLAAPSFAAQTTMLLSQKSDVNYLGWSTDESKVARQEVYRGTTSNPDLRERIAVLDAETR
 TFKDADTNSGLNYWYVWDVVS ENQAQVVSNAVTTAPNAGPLRAAKASSECKPGATFENRTVDCGGVTIGTS
 CPNDSDKQKPLIILKNATVKNLRI SASGGADGIHCDSGNCTIENVIWEDICEDAATNNGKTMTIVGGIAHN
 AKDGYGKPKVLQHNSKNSTTVVKGNFTLTGEHGKLRSCGDCSNNGGPRFLT VTSATVNGTIDS IAGVN
 RNYGDVATISGLKIKNYKEGKPPVCEEFGKGVVKGQGST EKYGEKWDTTNCKVSRSGVSKL

- **Pell-D5 (voir Figure 22 et 23).**
Pell.

Accession	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	Score	Description
E0SM75	20,64	6	36,7	270,59	Endo-pectate lyase OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=pell PE=4 SV=1 - [E0SM75_DICD3]

Couverture de séquence d4E0SM75 [Pell]

MFKYVIPLCA LTAAAPSF AA QTTLMLSQK **S DVNYLGWSTD ESK** VARQEVY RGTTSNPDLR ERIAVLDAET RTFKDADTNS
GLNYWYVVDV VSENQAQVVS NAVTTAPNAG PLRAAKASSE CKPGATFENR TVDCGGVTIG TSCPNDSDKQ KPLIILKNAT
VKNLRISASG GADGIHCD SG NCTIENVIWE DICEAATNN GK **TMTIVGGI AHNAK** DGYGG KPDKVLQHS KNSTTVVK **GN**
FTLTGEHGK L WRSCGDCSNN GGPR **FLTVTS ATVNGTIDSI AGVNRNYGDV ATISGLK** IKN YKEGKPPVCE EFKGVVKGQG
STEKYGEKWD TTNCKVSRSG VSKL

Fréquence peptides d4E0SM75 [Pell].

Peptides**	Nbre de spectres MSMS	IonScore max
SDVNYLGWSTDESK	1	67
FLTVTSATVNGTIDSIAGVNR	2	64
GNFTLTGEHGK	1	52
TMTIVGGIAHNAK	1	49
NYGDVATISGLK	1	48

OmpA.

Accession	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	Score	Description
E0SN28	38,24	13	37,6	609,97	Outer membrane protein A (3a;II*;G;d) OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=ompA PE=3 SV=1 - [E0SN28_DICD3]

Couverture de séquence d'E0SM28 [OmpA].

MKKTAAIAIV ALAGFATVAQ AAPNDNTWYA GAKLGWSQYH DTGLTGNGYN VTNAAQNLG AGAFGGYQVN PYLGFEMGYD
WLGRMKYNGG NQGSFK **AQGV QLSAKLSYPI VDDLDIYTRL** GGFVSRDSDH DNSGLNDHDT GVSPLAAGV EYAITKNWAT
R **LDYQWVNNI GDASTVGGRP DNGLLSVGVS YRFGQETAAP APVIAAPAPT PAPAPVVQTK R**FTLKSVDLF NFNKATLKPE
GQR **SLDQLYS QLSTLDPK** DG SVVVLGFTDR **LGSDQYNQTL STK** RAQTVVD YLVHKGIPAN KISARGMGK **A NPVSGSTCTN**
VKARAALIDC LAPDR RVEIE VKGIKDVVTQ PQA

OutD.

Accession	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	Score	Description
Q01565	7,61	3	76,2	118,28	Type II secretion system protein D OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=outD PE=1 SV=1 - [GSPD2_DICD3]

Couverture de séquence de Q01565 [OutD].

MLGKGIKSW GWLGLTVLL L GSPCGWAAEF SASFKGTDIQ EFINTVSKNL NKTVIDPTV RGTISVRSYD MMNEGQYYQF
FLSVLDVYGF SVVPMDNV L KVIRSKDAKS SSIPLANNEQ PGIGDELVTR VVPLNNVAAR DLAPLLRQLN DNAGAGTVVH
YEPSNVLLMT GRAAVIKRLV DIVNTVDKTG DREMTVPLT YASAEDVAKL VNDLNKSDK NALPSTMLAN VVADGRNTSV
VVSGEENARQ RAVEMIRQLD RKQVVQGGTK VIYLKYAK **AL DLIEVLAGNG TSGNR** NSSSS NASRPSSPRS GSSNSNSSS
GSSGSSSGSS SSSSSSSSMG FGSFAGSTSS SGGRTITIQQ KEVTVRAHDQ TNSLIITAPP DIMR **DLEQVI NQLDIR** RPQV
LVEAIIAEIQ DADGLNLGIQ WANKRAGMTQ FTNTGIPIST AVIGTDQFR **S NGTLTTAYAS ALSSFNGVTA GFYR** GNWSML
LTALSSDSKN DVLATPSIVT LDNMEATFNV GQEVPLTGS QTSADNIFN TVERKTVGIK LRVKPPQIN EG DSVLLQIEQE
VSSVADSNSS TNSSLGVTFN TRTVNNVAVM TNGETVVVVG LDKTSVESN DKVPLGDI P WLGLSFRSKS QEVKRKNLML
FLRPITIRDP GQFQEASINK YRSFNNEQQQ QRGEGNGVLD NNTLRLSGGN TYTFRQVQSS ISDFYKPEGR

Peptides**	Nbre de spectres MSMS	IonScore max
DLEQVINQLDIR	1	72
ALDLIEVLAGNGTSGNR	1	55
SNGTLTTAYASALSSFNGVTAGFYR	1	47

- Pell-1 (voir Figure 23 plus bas).

OutD.

Accession	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	Score	Description
Q01565	14,23	11	76,2	376,25	Type II secretion system protein D OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=outD PE=1 SV=1 - [GSPD2_DICD3]

Couverture de séquence de Q01565 [OutD].

MLGKGIKKSWGWLGLTVLLLGSPCGWAAEFASFKGTDIQEFINTVSKNLNKTVIIDPTVRGTISVRSYDMMNEGQYYQFFLSVLDVY
GFSVVPMDNGLVKVIRSKDAKSSSIPLANNEQPGIGDELVTRVPLNNVAARDLAPLLRQLNDNAGAGTVVHYEPSNVLLMTGR
AAVIKRLVDIVNTVDKTDGDEMVTPLTYASAEDVAKLVNDLNKSDEKNALPSTMLANVVADGRTNVSVVSGEENARQRAVEMIRQLDRKQV
VQGGTKVIYLYKAKALDLIEVLAGNGTSGNRNSSSSNASRPSRSGSSSNSSSSSGSSSSSGSSSSSSSSSSSMGFGSAFGSTSSSG
GRTITIQGKEVTVRAHDQTNLSIITAPPDIMRDLEQVINQLDIRRPQVLVEAIIAEIQDADGLNLGIQWANKRAGMTQFTNTGIPIST
AVIGTDQFRSNGTLTAYASALSSFNQVTAAGFYRGNWSMLLTALSSDSKNDVLATPSIVTLDNMEATFNVGQEVVLTGSQTTSADNI
FNTVERKTVGIKLRVKPQINEGDSVLLQIEQEVSSVADSNSSNSSLGVTFNTRTVNNAVMVTNGETVVVGGLLDKTSVESNDKVPLL
GDIPWLGLSLFRSKSQEVRKRNLMLFLRPTIIRDPGQFQEASINKYRSFNNEQQQQRGEGNGVLDNNTLR
LSSGNTYTFRRQVSSISDFYKPEGR

OutC.

Accession	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	Score	Description
Q01564	13,97	5	30,1	228,29	Type II secretion system protein C OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=outC PE=1 SV=1 - [GSPC2_DICD3]

MNISKLPPLSPSVIRRIIFYLLMLLFCQQLAMIFWRIGLPDAPVSSVQITPAQARQPVTLNDFTLFGVSPEK
NKAGALDASQMSNLPSTLNLSTGVMAGDDDSRSIAIISKDNEQFSRGVNEEVPGYNKIVSIRPDRVVLQYQGRYEVGLGLYSQEDSGSDGVPGAQVNEQL
QQRASTTMSDYVSFSPIMDNKLGQYRLNPGPKSDSFYRVGLQDNDMAVALNGLDLRDAEQAKKAMERMADVHNFTLTVERDQGRQDI
YMEFGGDE

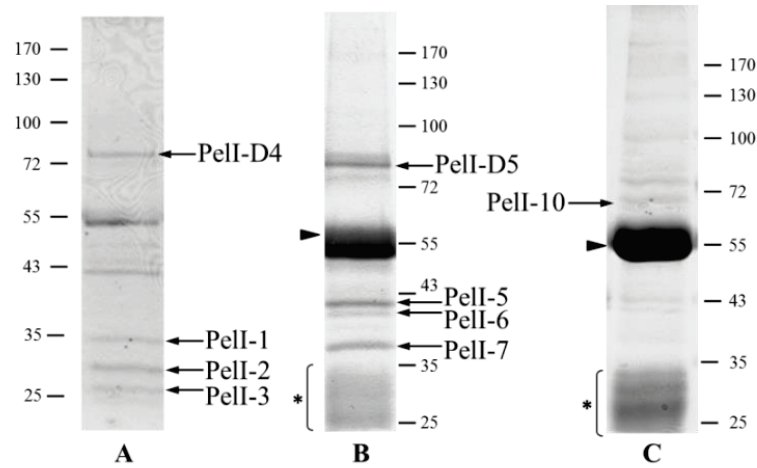


Figure 23. Résultats de différents tests d’immunoprécipitation de complexes formés par PelI D58pBpa (voir p. 142).

- Pell-2 (Figure 23).

OutD.

Accession	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	Score	Description
Q01565	8,03	6	76,2	185,76	Type II secretion system protein D OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=outD PE=1 SV=1 - [GSPD2_DICD3]

- Pell-3 (Figure 23).

OutD.

Accession	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	Score	Description
Q01565	6,76	3	76,2	133,50	Type II secretion system protein D OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=outD PE=1 SV=1 - [GSPD2_DICD3]

- **Pell-4 (Figure 23 en haut).**

OutD.

Accession	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	Score	Description
Q01565	3,52	2	76,2	140,08	Type II secretion system protein D OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=outD PE=1 SV=1 - [GSPD2_DICD3

- **Pell-10 (voir Figure 23 en haut).**

Pell.

Total	% Cov	Accession #	Name	Peptides(95%)
27,29	55,5	E0SM75	Endo-pectate lyase OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=pell PE=4 SV=1	13

Couverture de séquence d'E0SM75 [Pell].

```
MFKYVIPLCALTLAAPSFAAQTTLMLSQKSDVNYLGWSTDESKVARQEVYRGTTSNPDLREIAVLDAET
RTFKDADTNSGLNYWVVDVSENQAQVVSNAVTTAPNAGPLRAAKASSECKPGATFENRTVDCGGVTIG
TSCPNDSDKQKPLIILKNATVKNLRISASGGADGIHCDSGNCTIENVIWEDICEDAATNNGKTMTIVGGI
AHNAKDGYGGKPKVLQHNSKNSTTVVKGNFTLTGEHGKLWRSCGDCSNNGGPRFLTVTSATVNGTIDSI
AGVNRNYGDVATISGLKIKNYKEGKPPVCEEFGKGVVKGQGSTEKYGEKWDTTNCKVSRSGVSKL
```

Fréquence peptides d'E0SM75 [Pell].

Peptides**	Nbre de spectres MSMS	Confiance max
IAVLDAETR	10	99
TMTIVGGIAHNAK	10	99
ASSECKPGATFENR	6	99
DGYGGKPKVLQHNSK	6	99
NYGDVATISGLK	6	99
SDVNYLGWSTDESKVAR	6	99
SDVNYLGWSTDESK	4	99
TVDCGGVTIGTSCPNDSDKQKPLIILK	4	99
SATVNGTIDSIAGVNR	3	99
AQTTLMLSQK	2	66
ERIAVLDAETR	2	94
FLTVTSATVNGTIDSIAGVNR	2	99
GTIDSIAGVNR	2	90
AVTTAPNAGPLR	1	99
GNFTLTGEHGK	1	75
YGEKWDTTNCK	1	99

OmpA.

% Cov	Accession #	Name	Peptides(95%)
55,2	E0SN28	Outer membrane protein A (3a;II";G;d) OS=Dickeya dadantii (strain 3937) GN=ompA P	15

```
MKKTAAIAIAVALAGFATVAQAAPNDNTWYAGAKLGWSQYHDTGLTGNGYNVTNAAQNQLGAGAFGGYQVNP
YLGFMGYDWLGRMKYNGGNQGSFKAQGVQLSAKLSYPIVDDLDIYTRLGGFVSRTDSHDNSGLNDHDTGV
SPLAAVGEYAIKTNWATRLDYQWVNNIGDASTVGGRPDNGLLSVGVSYRFGQETAAPAPVIAAPAPTAP
APVVQTKRFTLKSVDLFNFNKATLKPEGQRSIDQLYSQLSTLDPKDGSVVVLGFTDRLGSDQYNQTLSTKR
AQTVDVYLVHKGIPANKISARGMGKANPVS GSTCTNVKARAALIDCLAPDRRVEIEVKGIKDVVTQPQA
```

1 Substrate recognition by the bacterial type II secretion system: more than a simple
2 interaction.

3
4 Camille Pineau^{1,2,3}, Natalia Guschinskaya^{1,3}, Xavier Robert⁴, Patrice Gouet⁴, Lionel
5 Ballut^{4*} and Vladimir E. Shevchik^{1,2,3*}

6
7 ¹Université Lyon 1, F-69622 Lyon, France.

8 ²INSA-Lyon, F-69621 Villeurbanne, France.

9 ³CNRS, UMR5240, Microbiologie Adaptation et Pathogénie, F-69622 Lyon, France.

10 ⁴Laboratory for Biocrystallography and Structural Biology of Therapeutic Targets, Molecular
11 and Structural Bases of Infectious Diseases, CNRS UMR5086, F-69367, Lyon, France

12
13 *To whom correspondence should be addressed. E-mail: vladimir.shevchik@insa-lyon.fr

14 lionel.ballut@ibcp.fr

15

16 **Running title:** Substrate recognition by type II secretion system

17

18 **Keywords:** protein secretion/bacterial pathogenesis/membrane proteins/secretin/PDZ domain/

19

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/mmi.12744

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

Abstract

Type II secretion system (T2SS) is a multiprotein trans-envelope complex that translocates fully-folded proteins through the outer membrane of Gram-negative bacteria. Although T2SS is extensively studied in several bacteria pathogenic for humans, animals and plants, the molecular basis for exoprotein recruitment by this secretion machine as well as the underlying targeting motifs remain unknown. To address this question, we used bacterial two-hybrid, surface plasmon resonance, in vivo site-specific photo-cross-linking approaches and functional analyses. We showed that the fibronectin-like Fn3 domain of exoprotein PelI from *Dickeya dadantii* interacts with four periplasmic domains of the T2SS components GspD and GspC. The interaction between exoprotein and the GspC PDZ domain is positively modulated by the GspD N1 domain, suggesting that exoprotein secretion is driven by a succession of synergistic interactions. We found that an exposed 9-residue-long loop region of PelI interacts with the GspC PDZ domain. This loop acts as a specific secretion signal that controls exoprotein recruitment by the T2SS. Concerted in silico and in vivo approaches reveal the occurrence of equivalent secretion motifs in other exoproteins, suggesting a plausible general mechanism of exoprotein recruitment by the T2SS.

1

2 **Introduction**

3 Gram negative bacteria have evolved several sophisticated systems dedicated to the secretion
4 of proteins implicated in survival and pathogenesis. Among them, the type II secretion system
5 (T2SS) is used for the translocation of folded proteins across the outer membrane. This
6 secretion process involves two steps. The proteins to be secreted (also referred to as
7 exoproteins) are translocated into the periplasm via the general Sec or Tat export pathways
8 (Voulhoux et al., 2001). During this passage, the respective N-terminal signal peptide is
9 cleaved off. Once in the periplasm, the Sec-dependent exoproteins are folded, before being
10 targeted to the T2SS. This complex molecular machine is composed of twelve to fifteen
11 proteins (generically called GspA to GspO, for General Secretion Pathway) and most of them
12 are present in multiple copies. Four of the T2SS components, GspC, L, M and F, form a
13 platform in the inner membrane to which the cytoplasmic ATPase GspE is linked (Py et al.,
14 2001). The secretin GspD builds up a multimeric pore in the outer membrane through which
15 the folded exoproteins can be translocated (Chami et al., 2005; Reichow et al., 2010). The
16 pilotin GspS assures the targeting and assembly of GspD in the outer membrane (Gu et al.,
17 2012a). The periplasmic domains of GspD interact with those of the inner membrane protein
18 GspC (Korotkov et al., 2011; Gu et al., 2012b), providing the structural and functional
19 integrity of the machine. Five pseudopilins, GspG, H, I, J and K, are thought to form a fibrous
20 pilus-like structure in the periplasm (Korotkov and Hol, 2008; Cisneros et al., 2012). The
21 current models suggest that cyclic assembly-disassembly of such a pilus can promote the
22 translocation of exoproteins through the secretin pore (Douzi et al., 2012; Campos et al.,
23 2013). Although substantial progress has recently been made in the structural and functional
24 characterization of the T2SS (see Korotkov et al. (2012) for a recent review), many aspects of

1 its assembly and action remain elusive and speculative. In particular, the mode of recruitment
2 of substrates is probably one of the most puzzling facets of the T2SS.

3 The T2SS substrates do not share any obvious common protein sequence. The
4 evidence suggests that only appropriately folded exoproteins are targeted to the secretion
5 machine (Hirst and Holmgren, 1987; Pugsley, 1992). The periplasmic folding of exoproteins
6 can include disulfide bond formation and multimerization (Bortoli-German et al., 1994;
7 Hardie et al., 1995; Shevchik et al., 1995) consistent with a highly ordered tertiary and
8 quaternary structure. A widely shared hypothesis is that the secretion signal is of a structural
9 nature. It could be a patch signal, within the tertiary structure, emanating from different parts
10 of the polypeptide chain. Many studies have attempted to define such a targeting signal in
11 different T2SS substrates. Previous reports have indicated several rather long zones, of 30 to
12 80 residues, necessary for the secretion of native substrates and/or some reporter proteins (Lu
13 and Lory, 1996; Sauvonnnet and Pugsley, 1996; Francetic and Pugsley, 2005). However,
14 because of the different bacterial models used, these data are often difficult to compare and
15 rationalize. Mapping of the regions involved in secretion of the pectate lyase PelC has
16 suggested three large regions essential for its targeting to the T2SS (Lindeberg et al., 1998). A
17 mutagenesis study of the polygalacturonase PehA has also suggested the existence of three
18 separate regions, of about fifty residues each, important for secretion (Palomäki et al., 2002).

19 A study in *Dickeya dadantii* has indicated that diverse exoproteins secreted by the same T2SS
20 may possess several different targeting signals (Bouley et al., 2001). Nevertheless, the
21 underlying targeting motifs have not, as yet, been revealed. Moreover, possible interactions of
22 the presumed secretion regions with the T2SS components have not been demonstrated.

23 Two components of T2SS, GspC and GspD, are thought to be involved in the
24 recognition of exoproteins (Lindeberg et al., 1996; Possot et al., 2000). The N-terminal region
25 of the secretin GspD spans the periplasm and consists of four domains, N0 to N3, while the

1 conserved C-terminal domain is implicated in pore formation (Fig. 1A) (Chami et al., 2005;
 2 Korotkov et al., 2009; Reichow et al., 2010). The inner membrane protein, GspC, possesses a
 3 single transmembrane segment (TMS) and two periplasmic domains, the homology region
 4 (HR) and PDZ (Fig. 1B) (Korotkov et al., 2006; Login and Shevchik, 2006; Gu et al., 2012b).
 5 The periplasmic domains of GspC and GspD are involved in multiple reciprocal interactions
 6 that suggest their dynamic assembly in the periplasm (Douzi et al., 2011; Korotkov et al.,
 7 2011; Gu et al., 2012b). Region swapping between heterologous counterparts has indicated
 8 that the N-terminal region of GspD and the PDZ domain of GspC determine the secretion
 9 specificity (Bouley et al., 2001). The PDZ domains are protein-protein interaction modules
 10 involved in scaffolding and cell signalling in eukaryotes and bacteria. Usually PDZ
 11 specifically interacts with a C-terminal linear patch of the partner protein (Tonikian et al.,
 12 2008). However, no interaction involving the PDZ domain of GspC has been detected up to
 13 now. In contrast, a direct interaction of exoproteins with the periplasmic region of
 14 *Pseudomonas aeruginosa* GspC, which is naturally lacking PDZ, has recently been
 15 demonstrated (Douzi et al., 2011). Similarly, interactions between some exoproteins and the
 16 periplasmic region of GspD have been reported, although the exact nature of the domains and
 17 sites concerned has not been established (Shevchik et al., 1997a; Reichow et al., 2010; Douzi
 18 et al., 2011). Recently, direct interactions, between exoproteins and some of the pseudopilin
 19 subunits forming the tip of the pilus, have been reported (Douzi et al., 2011). They may
 20 reflect a late step of secretion, when the pseudopilus is thought to push exoproteins through
 21 the secretin pore, whereas the interactions with GspC and GspD may correspond to early steps
 22 involving the recognition and recruitment of exoproteins.

23 The T2SS of the phytopathogenic bacterium *D. dadantii* (ex *Erwinia chrysanthemi*),
 24 called Out, secretes a dozen pectinases and one cellulase (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al.,
 25 2014). Structural data are available for many of these exoproteins (Yoder et al., 1993; Jenkins

1 et al., 2004; Fries et al., 2007), providing exceptional tools for the secretion studies. Here, to
2 gain a better understanding of the molecular mechanisms of protein recognition by T2SS, we
3 used the pectate lyase PelI of *D. dadantii* and its ortholog, Pel3 from *Pectobacterium*
4 *carotovorum*, which is not secreted by *D. dadantii* (Bouley et al., 2001). PelI and Pel3 consist
5 of two structural domains, the fibronectin-like type 3, Fn3, and the catalytic Cat (Fig. 2A)
6 (Creze et al., 2008). We found that the Fn3 domain of PelI interacts with two domains of
7 OutC and two periplasmic domains of OutD. The interaction with the PDZ domain of OutC
8 involves a dissimilar loop of Fn3, carrying a 3_{10} -helix. We found that this Fn3/PDZ
9 interaction is positively modulated by the N1 domain of OutD and that it is directly involved
10 in substrate recognition by the secretion machine. Concerted in silico and in vivo approaches
11 suggest the occurrence of an equivalent secretion signal in the other exoproteins. These data
12 provide the first experimental evidence of the molecular mechanisms that govern the
13 recognition and recruitment of exoproteins by T2SS.

14

15 Results

16 **Fragment swapping, between two orthologous secretion substrates, highlights an essential** 17 **structural motif**

18 Pel3, a PelI ortholog from *P. carotovorum* that shares 67% of sequence identity with PelI, is
19 not secreted by *D. dadantii* (Fig. 2B, lane 2). To search for the regions of PelI that are
20 important for secretion, domain swapping between PelI and Pel3 was carried out. A hybrid
21 carrying the Fn3 domain of PelI and the Cat domain of Pel3, Fn3(I)-Cat(3), was efficiently
22 secreted by *D. dadantii* but the inversely composed Fn3(3)-Cat(I) mainly remained in the
23 cells (Fig. 2A and B, compare lanes 3 and 4). These data indicate that Fn3(3) lacks an
24 essential part of the information required for secretion by the T2SS of *D. dadantii*. However,
25 since Fn3(3)-Cat(I) was secreted more efficiently than Pel3, the Cat(I) domain does also

1 possess some specific secretion signal(s). More detailed segment swapping allowed us to
2 identify a linear sequence of 14 residues (G52 to V65), critical for secretion. Indeed, hybrid
3 h14 was efficiently secreted, whereas h13 was mainly retained in the cells (Fig. 2B and C,
4 lanes 5 and 6). Site-directed mutagenesis reduced this segment to 9 residues (G52 to R60)
5 (Fig. 2B and C, lanes 7 and 8). This region consists of the extended loop 3, carrying a 3_{10} -
6 helix and bordered by the β -strands 3 and 4 (Fig. 2C). This loop is located on the opposite
7 side of the Fn3/Cat interface and is easily accessible for external contacts (Fig. 2A). Further
8 mutagenesis showed that substitutions in this segment by equivalent residues from Pel3
9 impaired or even halted secretion (Fig. 2B and C lanes 9 to 13). Thus, the integrity of loop 3
10 seems to be important for PelI secretion. This structural element could constitute, or be a part
11 of, the secretion signal.

12

13 **The periplasmic domains of OutC interact with the secreted protein**

14 Since the periplasmic regions of two T2SS components, OutC and OutD, are thought to be
15 involved in the recognition of exoproteins, we examined whether the Fn3 domain of PelI
16 interacts with these components. The periplasmic region of OutC consists of HR and PDZ
17 domains while that of OutD is composed of four domains, N0 to N3 (Fig. 1). First, the
18 bacterial two-hybrid assay, based on the reconstitution of adenylate cyclase (CyaA) activity,
19 was employed (Karimova et al., 1998). Since neither Fn3 nor the periplasmic OutC and OutD
20 domains contain disulfide bonds, they are compatible with this assay, which detects protein
21 interactions in the cytoplasm. The tested domains were fused to T18 or T25 subunits of CyaA
22 in a manner that mimics their natural arrangement, i.e. the C-terminus of Fn3 was fused to
23 T18 such that the latter took the place of the catalytic domain of PelI (Fig. S1, native-like
24 arrangement). Similarly, the periplasmic domains of OutD were fused to the N-terminus of
25 T25, whereas the HR and PDZ domains of OutC were fused to the C-terminus of T25.

1 Combinations of Fn3, with the full-length periplasmic region of OutC (Cp) or with the
 2 isolated HR and PDZ domains, produced significant and almost similar, levels of β -
 3 galactosidase (Fig. 3A, lanes 5-7) suggesting that Fn3 interacts with both HR and PDZ. In this
 4 two hybrid assay, an interaction mediates a positive feedback loop via synthesis of cAMP that
 5 causes an increase in expression of CyaA-fusions, which are controlled by Plac. Accordingly,
 6 as shown by immunoblotting, the detected interactions lead to an increasing amount of the
 7 tested domains but conversely, when expressed alone, they were barely detectable (Fig. 3B,
 8 compare lanes 1-4 to 5-7). When the Fn3 and T18 domains were inverted (Fig. S1), no
 9 interaction was observed with PDZ and HR (Fig. 3A, white histograms), indicating that in this
 10 case, the interacting face of Fn3 is masked by T18.

11 Surface plasmon resonance (SPR) was employed to further investigate these detected
 12 Fn3/OutC interactions. Fn3 interacted tightly with the PDZ-bound sensor chip and the kinetic
 13 analysis of the SPR sensorgrams gave a dissociation constant (K_D) of $\sim 1.33 \mu\text{M}$ when fitted
 14 with a two-state reaction model (Fig. 3C, top and Table S1). This interaction, with a similar
 15 K_D , was also detected in the opposite direction, with a Fn3-bound sensor chip (Fig. 3C,
 16 bottom). To show the relevance of the PDZ/Fn3 interactions detected by SPR, we used a PDZ
 17 derivative carrying a cysteine residue in the place of D160. The PDZ^{D58C} derivative was fully
 18 dimeric in vitro and it did not interact with Fn3(I) in SPR (Fig. S2). Apparently, the PDZ/Fn3
 19 interaction site was hindered by artificial dimerization of PDZ. Multiple and single-cycle
 20 kinetics obtained with HR derivative also indicated an interaction with Fn3, however a
 21 positive drift at the start of dissociation phase did not permit to estimate a dissociation
 22 constant. When streptavidin (a negative control) was used as analyte with these sensor chips,
 23 no signal was observed. Therefore, the results of the two-hybrid and SPR assays show that the
 24 Fn3 domain of Peli interacts with the PDZ and HR domains of OutC.

25

1 **The N0 and N1 domains of OutD interact with the secreted protein**

2 A similar strategy was applied in order to search for interactions of Fn3 with the periplasmic
3 domains of OutD. In a two-hybrid assay, Fn3 interacted weakly with the derivative made up
4 of N0-N1-N2 domains (Fig. 3D, lane 2). When the individual OutD domains were probed, no
5 interactions were detected with N0 and N2 (Fig. 3D, lanes 4 and 6). In contrast, the
6 combinations Fn3/N1 and Fn3/N1-N2 generated a high level of β -galactosidase and were very
7 abundant in immunoblotting (Fig. 3D and E, lanes 3 and 5). These data indicate that Fn3
8 interacts with the N1 domain of OutD. It also seems likely that, in the N0-N1-N2 derivative,
9 the Fn3 interaction site of N1 is partially masked by the N0 domain since removal of N0
10 improved the interaction of the remaining N1-N2 with Fn3.

11 When the Fn3 and T18 domains were inverted (Fig. S1), no interaction was detected
12 with the tested OutD derivatives except for N0 (Fig. 3D white histograms). This suggests that,
13 depending on the exposed face of Fn3, it is able to interact with either the N0 or N1 domain
14 and, hence, Fn3 could carry two distinct sites of interaction with OutD. Further SPR
15 experiments corroborated this idea and demonstrated that the Fn3 domain bound to the N0
16 and N1 domains with similar affinities, K_D of about 18 and 13 μ M, respectively (Fig. 3F).

18 **The N1 domain exerts a positive effect on the Fn3/PDZ interaction**

19 The above data indicate multiple direct interactions between the Fn3 domain of Pell and the
20 periplasmic domains of OutC and OutD. To test whether some of these interactions could be
21 synergistic or competing, we examined the effect of various OutD domains on the Fn3/PDZ
22 interaction. In a two-hybrid assay, the T25-PDZ fusion was either expressed alone or co-
23 expressed with one of the OutD derivatives from the same plasmid, and combined with the
24 Fn3-T18 carrying plasmid (Fig. S1). The co-expression of the N0-N1-N2 derivative or of the
25 isolated N0 and N2 domains did not significantly affect the β -galactosidase level (Fig. 4A,

lanes 3, 4, 5 and 7). In contrast, the presence of the N1 domain had a relatively moderate but reproducible and significant positive effect on the Fn3/PDZ interaction (P-value < 0.01) (Fig. 4A, compare lanes 6 and 3). Immunoblotting showed that the tested protein derivatives, except for N2, were appropriately produced (Fig. 4B). Therefore, such a positive effect of the N1 domain on the Fn3/PDZ interaction could be interpreted as a cooperative modulation.

The Fn3 domains of PelI and Pel3 exhibit different specificities towards the PDZ domain of OutC

Since the chimeric pectate lyase carrying the Fn3 domain from Pel3, Fn3(3)-Cat(I), is barely secreted by *D. dadantii* (Fig. 2B), Fn3(3) can lack some secretion determinants carried by Fn3(I). Therefore, it could be expected that some interactions, detected between Fn3(I) and OutC or OutD of *D. dadantii*, would not be conserved with the heterologous Fn3(3).

In a two-hybrid assay, Fn3(I) and Fn3(3) generated similar β -galactosidase levels with the N1-N2 and N1 domains of *D. dadantii* OutD (Fig. 4C, lanes 2 and 3). Consistent with this, these fusion pairs were equally abundant in immunoblotting (Fig. 4D, panels 2 and 3). In contrast, the combinations of Fn3(I) and Fn3(3) with PDZ behaved differently from each other: Fn3(3)/PDZ generated less β -galactosidase and were barely visible in immunoblotting (Fig. 4C and D, panel 4). This indicates that, contrary to the cognate Fn3(I), the heterologous Fn3(3) does not interact well with the PDZ domain from *D. dadantii*.

The SPR experiments further corroborated these results and demonstrated that each, N0 and N1 domain of OutD shows a similar binding affinity to Fn3(3) and Fn3(I) (Fig. 3F and S3A and B). In contrast, the PDZ domain of OutC bound with a higher affinity to Fn3(I) than to Fn3(3), showing K_D values of about 1.33 μ M and 3.88 μ M, respectively (Fig. 3C and S3C and D). Thus, these data suggest that the Fn3/PDZ interaction involves some elements of

1 Fn3 specific for PelI, whereas the interfaces with the N0 and N1 domains of OutD may be
2 conserved in PelI and Pel3.

3

4 **The loop 3 of PelI is involved in the interaction with PDZ**

5 The data above suggest that the Fn3/PDZ interaction involves elements of Fn3 specific for
6 PelI and, hence, absent or dissimilar in Pel3. Loop 3 of the Fn3 domain, is not conserved
7 between PelI and Pel3 and seems to be critical for protein secretion by the *D. dadantii* Out
8 system (Fig. 2). To assess the role of this structural element in the interactions with OutC and
9 OutD, a chimeric Fn3 domain was constructed (referred to as Fn3(Lp)), in which the residues
10 Gly52 to Arg60 of PelI were replaced by their counterparts from Pel3 (Fig. 2C, line 14).
11 When chimeric Fn3(Lp) was assessed with PDZ in the two-hybrid assay, the β -galactosidase
12 activity decreased to a basal level (Fig. 4C, lane 4). Consistent with this, the T18-
13 Fn3(Lp)/PDZ-T25 pair was barely detectable by immunoblotting (Fig. 4D, panel 4),
14 indicating that these two fusions do not interact together and hence, they do not induce a
15 positive regulation feedback loop. Thus, introduction of the heterologous loop 3 prevents
16 interaction of Fn3 and PDZ. In contrast, although, in combination with the OutD derivatives,
17 Fn3(Lp) produced somewhat less β -galactosidase than the native Fn3(I), they both were
18 equally abundant and generated similar immunoblotting patterns (Fig. 4D panels 2 and 3),
19 indicating that the interactions with OutD are not significantly impaired by the heterologous
20 loop. Thus, these data are consistent with direct involvement of loop 3 of the Fn3(I) domain in
21 the interaction with the PDZ domain of OutC.

22

23 **Functional implication of PDZ/loop3^{PelI} interaction in the secretion process**

24 To place the presumed PDZ/loop 3 interaction in the context of a functional T2SS, we wonder
25 whether the heterologous PDZ_P (from *P. carotovorum*) can promote secretion of the hybrid

1 PelI(Lp) carrying the loop 3 from Pel3. However, PelI(Lp) was barely detectable in both *D.*
 2 *dadantii* and *E. coli*. Consequently, we selected two other, more stable, PelI hybrids, h13 and
 3 h14, that differ in the origin of their respective loop 3, from Pel3, in the case of h13, and from
 4 PelI, in h14 (Fig. 2A and C, lines 5 and 6). The hybrid pelI genes were expressed from a
 5 plasmid in the *D. dadantii* Δ outC pelI strain, which also carried another plasmid encoding
 6 OutC, either from *D. dadantii* (OutC_D), or from *P. carotovorum* (OutC_P) or one of the PDZ
 7 domain-swapped hybrids (OutC_{P-PDZ-D} or OutC_{D-PDZ-P}) (Fig. 5A). Some PelI h14 was secreted
 8 in the presence of OutC_D and OutC_{P-PDZ-D}, whereas PelI h13 was not secreted with any of the
 9 OutC variants (Fig. 5C). These data show that the PDZ_P domain is unable to drive secretion of
 10 PelI h13, carrying the cognate loop 3 from Fn3(3), and suggest that PelI h13 possesses some
 11 additional secretion determinants, which could be dependent on PDZ_D.

12 To examine whether these PelI hybrids could be secreted in the presence of the two
 13 different OutC counterparts, similar experiments were performed with the *D. dadantii* pelI
 14 strain, which carries a functional chromosomal outC_D allele and an exogenous, plasmid-
 15 expressed, outC. The native and exogenous OutC variants were expressed at roughly similar
 16 levels (Fig. 5B) that could allow formation of a mixed secretion machine. Spectacularly,
 17 secretion of PelI h13 was significantly improved in the presence of OutC_{D-PDZ-P}, which carries
 18 the PDZ domain from *P. carotovorum* (Fig. 5D, lane 4). The presence of this OutC variant
 19 had no obvious effect on PelI h14 but decreased the secretion of the native pectate lyase PelD
 20 (Fig. 5D, lane 4). The latter result is very indicative, since PelD is strictly dependent on the
 21 cognate PDZ_D and it is not secreted in the presence of OutC_{D-PDZ-P} alone (Fig. 5C, lane 4).
 22 These data indicate the formation of a mixed secretion machine, where the native OutC_D and
 23 exogenous OutC_{D-PDZ-P} can act together and interact with secretion motifs originating from
 24 the cognate substrates, PelI and Pel3 respectively. This dual recognition seems to be essential

1 for the secretion of PelI h13 because it was not secreted in the presence of either OutC_D or
2 OutC_{D-PDZ-P} alone (Fig. 5C, lanes 2 and 4).

3 Therefore, the opposite effects of the OutC_D/OutC_{D-PDZ-P} pair on the secretion of PelI
4 h13 and h14 can be directly attributed to the patchwork nature of their secretion signals. Since
5 the only difference between h13 and h14 is the origin of their respective loops 3, these data
6 indicate that PDZ_P interacts directly with the cognate loop 3, originated from Pel3, and,
7 hence, permits the secretion of PelI h13.

9 **In silico search for potential loop 3-like regions in other exoproteins of *D. dadantii***

10 The data above suggest that a particular structural element of the Fn3 domain of PelI, loop 3,
11 acts as a secretion signal, through interaction with the PDZ domain of OutC. Since several
12 other exoproteins of *D. dadantii* are also secreted in a PDZ-dependent way (Bouley et al.,
13 2001), they could possess an equivalent secretion signal. The existence of this type of
14 structural element was investigated within several *D. dadantii* exoproteins with known atomic
15 structure, the pectate lyases PelA, PelC, PelE and PelI. To identify a common sequence-
16 structural pattern that could correspond to a loop 3-like secretion signal, the TopMatch
17 program was employed (Sippl and Wiederstein, 2012). By using atomic coordinates of loop 3
18 as the query structure, we found, within these exoproteins, several areas that could correspond
19 to this type of secretion signal (Fig. 6). Notably, such a motif was also identified in the
20 catalytic domain of PelI. A concerted analysis of all these regions did not lead to a sequence
21 consensus pattern. Sequence homologies between the query fragment and the identified
22 regions are weak and their pair-to-pair sequence identities vary from 8 to 30%, with a mean
23 value around 15%. However, several common structural features are apparent, for example
24 each identified region is exposed at the surface and accessible, which seems to be mandatory

1 for a targeting signal. In addition, they are all located in loops protruding from the central
2 domain of exoprotein and joining β -strands.

3

4 **Functional implications of in silico predictions**

5 To investigate the biological significance of this analysis, firstly, site directed mutagenesis of
6 pectate lyase PelB was performed. Because of the different nomenclatures, PelB, from the D.
7 dadantii strain 3937, is in fact the closest homolog of the structurally characterized PelC from
8 strain EC16 (92% identity) (Fig. 6B). When the two aspartate residues, D178 and D182,
9 located in one of the two presumed secretion signals of PelB were mutated, secretion of the
10 D178K variant was obviously impaired (Fig. S4), indicating that this site is implicated in
11 secretion.

12 To further investigate the functional role of these presumed secretion signals, in vivo
13 and in situ, a site-specific photo-cross-linking approach was used (Farrell et al., 2005). In this
14 technique, a photoreactive amino acid analogue, p-benzoyl-L-phenylalanine (pBPA), is
15 incorporated into a protein in vivo, to replace the residue of interest. Subsequently, the UV
16 irradiation of living bacteria producing these variants should lead to cross-linking with
17 proteins that come into close contact (within 4Å) with the pBPA residue. In order to examine
18 the two presumed secretion motifs of PelI (Fig. 6A), T53, T54, S55, N56, P57, D58, L59, R60
19 and E61 of the loop 3 of Fn3 and K215, Y218, K221 and D223 of the catalytic domain were
20 individually mutated to the amber codon that permit incorporation of pBPA. In all cases
21 except L59, the full-length PelI was produced only in the presence of pBPA, indicating its
22 specific incorporation in the targeted exoprotein (Fig. S5A). In addition, with the K215, Y218,
23 K221 and D223 substitutions, PelI fragments corresponding to truncation at the position of
24 the amber mutation were also produced (Fig. S5A, right). Upon UV irradiation of the E. coli
25 cells producing various PelI-pBPA variants, the observed cross-linking patterns were much

the same, whether or not OutC and OutD were coexpressed (Fig. S5B). Moreover, no PelI complex with OutC or OutD could be detected, consistent with the absence of a functional T2SS in *E. coli*.

Feasibility of this approach was further tested in *D. dadantii*. With the exception of T54 and S55 substitutions, pBPA was efficiently incorporated in PelI. Furthermore, the pBPA-containing PelI variants were still partially secreted by *D. dadantii* (Fig. S6), indicating their recruitment by the secretion machine. Upon UV-irradiation of *D. dadantii* cells producing a pBPA substitution in the loop 3 of Fn3, some PelI adducts were observed with the D58 variant (Fig. 7A, lane 2). The two most abundant adducts of about 80 and 50 kDa were also observed in the *D. dadantii* Δ outC non-secretory strain (Fig. S7B) and hence, they do not seem to be directly involved in the secretion process. In contrast, the 65 kDa adduct cross-reacting with the OutC antibody was specific for a functional secretion system, indicating the formation of a PelI-OutC complex (Fig. 7A and S7B). The use of antisera raised against OutD, OutG, OutK, OutL and OutM revealed a complex between PelI^{D58} and OutD but not with the other tested components (Fig. 7A and S7A). Among the positions tested in the catalytic domain of PelI, some adducts, reactive with both PelI and OutC antisera were observed with K221 and D223 variants, consistent with a PelI-OutC complex (Fig. 7B). In contrast no specific complex could be detected with OutD antiserum (Fig. 7B).

To test whether the PDZ domain is implicated in the cross-linking with PelI, the OutC-h23 variant was used in the assay. OutC-h23 carries a non-functional hybrid PDZ domain, in which the region of R203 to K240 was replaced by its counterpart from the *P. carotovorum* OutC (Fig S8A and B). OutC-h23 does not permit secretion of the PDZ-dependent exoproteins by *D. dadantii* (Fig S8C). When the hybrid OutC-h23 variant was coexpressed with PelI^{D58} in the *D. dadantii* Δ outC pelI strain, no PelI-OutC cross-linking product was observed (Fig. 7C). This suggests that the loop 3 of PelI Fn3 interacts directly with the PDZ domain of OutC.

1 Although the amount of observed PelI-OutC and PelI-OutD complexes is relatively
2 low, it is nonetheless consistent with a short-time UV exposition and a transient nature of
3 these interactions. Collectively, these data corroborate the in silico analysis and show that,
4 during secretion, two sites of PelI, D58 and K221-D223, are in close contact with OutC.
5 Furthermore, the first secretion motif of PelI, covering D58, is proximal to OutC PDZ and to
6 OutD. This is consistent with the positive effect of OutD N1 on the Fn3/PDZ interaction
7 observed in the two-hybrid assay (Fig. 4A) and it suggests that the same secretion motif could
8 concomitantly or sequentially interact with these two components.

10 Discussion

11 The present study sheds light on the molecular mechanisms that govern substrate targeting
12 and recognition by the T2SS. We have demonstrated that Fn3, a small domain of the secreted
13 protein PelI, interacts directly with several individual domains of OutC (HR and PDZ) and
14 OutD (N0 and N1). Our data suggest that the Fn3/PDZ interaction is positively modulated by
15 the N1 domain of OutD and that it is directly involved in substrate selection by the secretion
16 machine. We found that a particular loop region of PelI, containing a 3_{10} -helix, is involved in
17 the interaction with the PDZ domain of OutC. Classic examples of PDZ/ligand interactions
18 involve the antiparallel addition of an extra β -strand into the peptide-binding groove (Remaut
19 and Waksman, 2006). However, in the PDZ domain of *V. cholerae* GspC, this site is wide and
20 might, a priori, accommodate an α -helix (Korotkov et al., 2006). Consistent with this
21 hypothesis, several lines of evidence suggest a direct interaction between the loop 3 of Fn3
22 and the PDZ domain of OutC. First, the introduction of a heterologous loop 3 in the Fn3
23 domain of PelI prevented its interaction with the cognate PDZ_D. Secondly, secretion of the
24 hybrid PelI h13, carrying this loop sequence from Pel3, increased in the presence of the
25 hybrid OutC_{D-PDZ-P} containing the cognate PDZ_P from *P. carotovorum*. Finally, a direct

1 interaction between loop 3 of PelI and OutC was demonstrated by in vivo site-specific photo-
2 cross-linking.

3 Interestingly, secretion of the hybrid pectate lyase h13 requires the simultaneous
4 presence of the two OutC counterparts, OutC_{D-PDZ-P} and OutC_D, carrying the PDZ domains
5 from *P. carotovorum* and *D. dadantii*, respectively (Fig. 5D). Since each of these OutC
6 variants alone was not able to promote the secretion of PelI h13 (Fig. 5C), this indicates that
7 the two OutC counterparts act together and form a mixed T2SS machine where each of them
8 recognizes a cognate secretion signal of PelI h13. These data indicate a direct interaction of
9 PDZ_P with the loop 3 originating from the related secretion substrate, Pel3. Furthermore, they
10 also suggest that PelI h13 carries at least one other secretion signal, but specific for PDZ_D.
11 Thus, it would be expected that two adjacent PDZ domains could interact simultaneously,
12 with the same molecule of PelI. This view seems to be spatially compatible with the estimated
13 proximity of adjacent OutC and OutD protomers in a presumed dodecameric cage-like
14 structure (Chami et al., 2005; Reichow et al., 2010; Wang et al., 2012), where several
15 equivalent neighbouring domains can be in contact with different sites of the same exoprotein.

16 Further in silico analyses corroborated this hypothesis and revealed an additional
17 “loop 3-like” secretion motif in the catalytic domain of PelI. This search also suggested that
18 some other exoproteins of *D. dadantii* possess secretion signals equivalent to loop 3 of the
19 Fn3 domain of PelI. The biological relevance of these in silico predictions was demonstrated
20 in vivo by photo-cross-linking, performed with actively secreting *D. dadantii* cells. The
21 exposed aspartate residues identified in the two “loop 3-like” secretion motifs of PelI, D58
22 and D223, interacted directly with OutC. Further site-directed mutagenesis analysis showed
23 direct implication of a similar identified site in the secretion of another exoprotein, PelB.

1 The three-hybrid assays demonstrated that the interaction between the Fn3 and PDZ
2 domains is stronger in the presence of the N1 domain of OutD. This synergistic effect may be
3 interpreted as a positive allosteric modulation, i.e. an interaction with the N1 domain causes
4 some subtle conformational displacements in Fn3, increasing its affinity to PDZ. The
5 “classic” interactions of PDZ domains also often have additional recognition motifs outside
6 the region of β -strand addition (Remaut and Waksman, 2006). Consistent with a dynamic
7 interplay of OutC PDZ and OutD during secretion, the photo-cross-linking assay showed that
8 loop 3 of Fn3 could interact with these two components. These data indicate that OutC and
9 OutD can act together or in sequence to recruit the same or very close targeting motif(s), for
10 instance the loop 3 and/or one of the adjacent β -strands. Indeed, the two-hybrid and SPR
11 assays suggest that the interaction Fn3/OutD N1 could involve elements conserved between
12 PelI and Pel3, hence most probably the β -strands. However, this hypothesis remains to be
13 addressed. The example of Fn3/PDZ/N1 could be a prototype of a more general mechanism of
14 exoprotein recruitment and progression through the secretion machine. Instead of a few, high-
15 affinity interactions, a succession of multiple feeble and transitory protein-protein contacts
16 may drive the progression of exoproteins through the T2SS.

17 However, it should be noted that some other exoproteins of *D. dadantii*, namely Pema
18 and CelZ5, do not require a PDZ domain and are secreted in its absence (Bouley et al., 2001).
19 Moreover, in some T2SSs, the respective OutC homologs either do not have any PDZ domain
20 or they possess a coil-coiled domain instead (Bleves et al., 1999; Peabody et al., 2003). In the
21 absence of PDZ, some other exoprotein-interacting domains, identified in this study, such as
22 HR, N0 and N1 can probably promote the secretion of dedicated exoproteins. Interestingly,
23 secretion kinetics in *D. dadantii* shows a hierarchical secretion of various exoproteins (Fig.
24 S9). The PDZ-dependent exoproteins, such as PelD, are secreted more efficiently and prior to
25 the PDZ-independent ones, such as Pema, and PelI, secretion of which is partially dependent

1 on the presence of a cognate PDZ domain, shows intermediate secretion kinetics. Therefore, it
2 is tempting to speculate that the PDZ domain has been adopted by the GspC components quite
3 recently to enable more efficient secretion of exoproteins. Remarkably, PilP, a component of
4 the type IV pili system ancestrally related to GspC, possesses an HR domain but no PDZ
5 domain. Further structural analysis of an exoprotein-PDZ complex is needed to address some
6 of these issues.

8 **Experimental Procedures**

9 **Strains, plasmids and growth conditions**

10 The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Tables S2 and S3. *D.*
11 *dadantii* strains carrying chromosomal mutant outD alleles encoding cysteine variants were
12 constructed by marker exchange-eviction mutagenesis (Bouley et al., 2001). A correct
13 recombination of the outD mutant alleles into the chromosome was checked by PCR and
14 sequencing. DNA manipulations were carried out using standard methods. Site-directed
15 mutagenesis was performed with the PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa) and the
16 primers listed in Table S4. The sequences of mutant and amplified genes were checked
17 (Eurofins MWG Operon). More details on plasmid construction are described in Supporting
18 Information.

20 **Bacterial two-hybrid assay**

21 The bacterial two-hybrid system (Karimova et al., 1998), kindly provided by G. Karimova,
22 was used as described (Lallemant et al., 2013). Combinations of protein derivatives fused to
23 T18 or T25 (Table S3) were co-transformed into the *E. coli* *cyaA* strain DHP1 and the
24 transformants were plated on MacConkey-maltose agar. The color of the colonies was
25 monitored at 30°C for 36-48 h. To quantify the protein interactions, DHP1 cells, carrying

1 appropriate plasmid combinations, were grown in LB supplemented with 1 mM isopropyl- β -
2 D-thiogalactopyranoside (IPTG), ampicillin and kanamycin at 28°C for 18 h and then used for
3 β -galactosidase assay, as described (Lallemant et al., 2013). The values of β -galactosidase
4 were expressed in Miller units per milligram of bacteria and then, were expressed as
5 percentage of that with the full-length T18-OutC/T25-OutC, considered as 100% (positive
6 control). All assays were performed from triplicate cultures on three to four different bacterial
7 transformants and on several different days; the means \pm standard errors (SE) were shown.

9 **Surface plasmon resonance (SPR) assays**

10 SPR measurements were performed using the Biacore T100 system (GE Healthcare). The
11 OutC, OutD and Fn3 derivatives were produced in *E. coli* BL21(DE3) from an appropriate
12 plasmid (Table S3) and purified by nickel or glutathione-affinity chromatography, as
13 described (Login et al., 2010) to the level compatible with structural analyses. Protein
14 solutions were 0.2 μ m filtered prior the experiments. Fn3(I), Fn3(3), N1 and PDZ (at 250,
15 600, 480 and 566 μ g/ml in 10 mM sodium acetate, pH 4.5 or 3.5, for PDZ), were immobilized
16 onto CM5 (carbomethylated dextran) sensor chip via amine coupling at a flow rate of 5
17 μ l/min according to the manufacturer's (amine coupling kit, GE Healthcare) instructions. A
18 control flow-cell was submitted to the coupling steps, the protein being omitted. Solutions of
19 N0 (10-106.7 μ M), N1 (10.6-133.3 μ M), Fn3(I) (5-50 μ M) and Fn3(3) (20-200 μ M) were
20 injected at 30 μ l/min at 25 °C in HBS-P+ buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl and
21 0.05% (v/v) P20 surfactant). 3M NaCl was used to regenerate the CM5-ligand surface. The
22 kinetic parameters k_a and k_d (association and dissociation rate constants, respectively) were
23 analyzed simultaneously using the Biaevaluation software 2.0.3. The sensorgrams obtained
24 for different concentrations of analyte were fitted simultaneously, constraining the kinetic rate
25 constants and the dissociation constant (K_D) to a single value for each set of curves. Apparent

1 equilibrium dissociation constants (K_D) were calculated as the ratio of k_d/k_a . R_{max} , the
2 maximal capacity of the surface was floated during the fitting procedure. The simplest 1:1
3 interaction model was always used as the first analyzed model. However, the best fit was
4 systematically obtained with a two state reaction model or with a bivalent analyte model
5 (Table S1). Models with heterogeneous ligand or heterogeneous analyte were also considered
6 but the SPR data did not fit with these models.

8 **Pectinase secretion assays**

9 Plate assay for whole pectinase secretion was performed as described (Bouley et al., 2001). *D.*
10 *dadantii* cells were patched onto polygalacturonate-containing plates and grown at 30 °C for
11 16 h. The plates were stained with a copper acetate solution to reveal degradation halos. The
12 halo size reflects the efficiency of pectinase secretion. For immunoblotting assay, *D. dadantii*
13 cells were grown in LB supplemented with galacturonate, 0.2 g.l⁻¹ and, when necessary, with
14 arabinose at 0.02 g.l⁻¹ and appropriate antibiotics at 28 °C for 14 h until early stationary
15 phase, OD₆₀₀ of 2.0. Culture supernatant and cells were separated by centrifugation and an
16 equivalent of 0.04 OD₆₀₀ of cell and supernatant fractions was loaded onto SDS-PAGE. When
17 necessary, the extracellular proteins were concentrated by precipitation with cold acetone. The
18 efficiency of secretion was estimated by immunodetection of secreted proteins, as described
19 (Login and Shevchik, 2006).

21 **In silico search for potential secretion signals**

22 The TopMatch Web service was employed to search for Fn3-like secretion signals in other
23 exoproteins of *D. dadantii* (Sippl and Wiederstein, 2012). Given a pair of protein structures,
24 this program computes a list of alignments, ordered by structural similarity balanced with
25 sequence homology. Atomic coordinates of loop 3 to β -strand 4 of the Fn3 domain of Pell

1 (residues G52 to V65) were used as the query structure against the following structural
2 targets: pectate lyases PelA (PDB 1JRG), PelC (PDB 2PEC), PelE (PDB 1PCL) and PelI
3 itself (PDB 3B4N). To reduce the risk of false-positives, the selected query sequence was
4 large enough, 14 residue-long, and encompassed β -strand 4. β -strand 4 was preferred to β -
5 strand 3 because it is shorter and structurally less rigidified. The possible bias that could
6 introduce the enclosure of this β -strand in the search was minimized by authorizing
7 permutations in the TopMatch algorithm. Finally, standard match parameters allowing
8 moderate spatial deviations between query and target in the construction of alignments were
9 used. The list of scored fitting regions, reported by TopMatch, was re-ranked by a concerted
10 assessment of the following criteria: root-mean-square error of superposition, measurement of
11 structural similarity based on Gaussian functions (S value) and visual examination of the
12 solutions superimposed to their target structures.

14 **In vivo photo-cross-linking**

15 Cells, carrying pSup-BpaRS-6TRN (Ryu and Schultz, 2006) and a pelI_TAG-expressing
16 plasmid were grown in BL supplemented with ampicillin and chloramphenicol at 30°C.
17 Overnight cultures were washed and diluted at an OD₆₀₀ of 0.3 into M9 medium containing 1
18 mM pBPA, 0.2 % glycerol, 0.01 % casamino acids, antibiotics and 0.2 % galacturonate to
19 induce synthesis of pectinases and Out proteins. After 8 h of growth, a 2 ml portion of cells
20 was either chilled on ice (control) or placed in a glass Petri dish and irradiated with an UV
21 lamp (Bio-Link BLX model, 365 nm) for 3 min at a distance of 10 cm. Irradiated cells were
22 collected by centrifugation, lysed in Laemmli sample buffer and an equivalent of 0.2 OD₆₀₀ of
23 cell was loaded on 9% Tris-Glycin SDS PAGE containing 6 M urea or on 5-12% Tris-Acetate
24 SDS PAGE. The proteins were detected by immunoblotting using antibodies raised against
25 PelI, OutC, OutD, OutG and OutK.

1

2 **Acknowledgements**

3 We thank G. Effantin and J. Cayron for excellent technical assistance and to G. Condemine,
 4 S. Reverchon, N. Cotte-Pattat and W. Nasser for critical reading of manuscript. We
 5 acknowledge funding from CNRS and a grant from French ANR-2010-BLANC-1531
 6 SecPath program and LyonBioPole.

7

8 **References**

- 9 Bleves, S., Gérard-Vincent, M., Lazdunski, A., and Filloux, A. (1999) Structure-function
 10 analysis of XcpP, a component involved in general secretory pathway-dependent protein
 11 secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 4012-4019.
- 12 Bortoli-German, I., Brun, E., Py, B., Chippaux, M., and Barras, F. (1994) Periplasmic
 13 disulphide bond formation is essential for cellulase secretion by the plant pathogen
 14 *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol* **11**: 545-553.
- 15 Bouley, J., Condemine, G., and Shevchik, V.E. (2001) The PDZ domain of OutC and the N-
 16 terminal region of OutD determine the secretion specificity of the type II Out pathway of
 17 *Erwinia chrysanthemi*. *J Mol Biol* **308**: 205-219.
- 18 Campos, M., Cisneros, D., Nivaskumar, M., and Francetic, O. (2013) The type II secretion
 19 system - A dynamic fiber assembly nanomachine. *Res Microbiol* **164**: 545-555.
- 20 Cisneros, D.A., Bond, P.J., Pugsley, A.P., Campos, M., and Francetic, O. (2012) Minor
 21 pseudopilin self-assembly primes type II secretion pseudopilus elongation. *EMBO J* **31**:
 22 1041-1053.
- 23 Chami, M., Guilvout, I., Gregorini, M., Rémigy, H., Müller, S.A., Valerio, M., et al. (2005)
 24 Structural insights into the secretin PulD and its trypsin resistant core. *J Biol Chem* **280**:
 25 2703-2708.
- 26 Creze, C., Castang, S., Derivery, E., Haser, R., Hugouvieux-Cotte-Patat, N., Shevchik, V.E.,
 27 and Gouet, P. (2008) The crystal structure of pectate lyase Peli from soft rot pathogen
 28 *Erwinia chrysanthemi* in complex with its substrate. *J Biol Chem* **283**: 18260-18268.

- 1 Douzi, B., Ball, G., Cambillau, C., Tegoni, M., and Voulhoux, R. (2011) Deciphering the Xcp
2 *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion machinery through multiple interactions with
3 substrates. *J Biol Chem* **286**: 40792-40801.
- 4 Douzi, B., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2012) On the path to uncover the bacterial type II
5 secretion system. *Phil Trans R Soc B* **367**: 1059-1072.
- 6 Farrell, I.S., Toroney, R., Hazen, J.I., Mehl, R.A., and Chin, J.W. (2005) Photo-cross-linking
7 interacting proteins with a genetically encoded benzophenone. *Nature Meth* **2**: 377-384.
- 8 Francetic, O., and Pugsley, A.P. (2005) Towards the identification of type II secretion signals
9 in a nonacylated variant of pullulanase from *Klebsiella oxytoca*. *J Bacteriol* **187**: 7045-
10 7055.
- 11 Freinkman, E., Chng, S.S., and Kahne, D. (2011) The complex that inserts lipopolysaccharide
12 into the bacterial outer membranes forms a two-protein plug-and-barrel. *Proc Natl Acad*
13 *Sci USA* **108**: 2486-2491.
- 14 Fries, M., Ihrig, J., Brocklehurst, K., Shevchik, V.E., and Pickersgill, R.W. (2007) Molecular
15 basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase. *EMBO J* **26**: 3879-3887.
- 16 Gouet, P., Robert, X., and Courcelle, E. (2003) ESPript/ENDscript: extracting and rendering
17 sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucl Acids Res* **31**:
18 3320-3323.
- 19 Gu, S., Rehman, S., Wang, X., Shevchik, V.E., and Pickersgill, R.W. (2012a) Structural and
20 functional insights into the pilotin-secretin complex of the type II secretion system. *PLoS*
21 *Pathog* **8**: e1002531.
- 22 Gu, S., Kelly, G., Wang, X., Frenkiel, T., Shevchik, V.E., and Pickersgill, R.W. (2012b)
23 Solution structure of homology region (HR) domain of type II secretion system. *J Biol*
24 *Chem* **287**: 9072-9080.
- 25 Jenkins, J., Shevchik, V.E., Hugouvieux-Cotte-Patat, N., and Pickersgill, R.W. (2004) The
26 crystal structure of pectate lyase Pel9A from *Erwinia chrysanthemi*. *J Biol Chem* **279**:
27 9139-9145.
- 28 Hardie, K.R., Schulze, A., Parker, M.W., and Buckley, J.T. (1995) *Vibrio* spp. secrete
29 proaerolysin as a folded dimer without the need for disulphide bond formation. *Mol*
30 *Microbiol* **17**: 1035-1044.
- 31 Hirst, T.R. and Holmgren, J. (1987) Conformation of protein secreted across bacterial outer
32 membranes: a study of enterotoxin translocation from *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad*
33 *Sci USA* **84**: 7418-7422.

1 Holm, L. and Park, J. (2000) DaliLite workbench for protein structure comparison.
2 Bioinformatics **16**: 566-567.

3 Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., and Shevchik, V.E. (2014) Bacterial pectate
4 lyases, structural and functional diversity. Environ Microbiol Rep. doi:10.1111/1758-
5 2229.12166.

6 Kabsch, W. and Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern
7 recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. Biopolymers, **22**: 2577-2637.

8 Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system
9 based on a reconstituted signal transduction pathway. Proc Natl Acad Sci USA **95**: 5752-
10 5756.

11 Korotkov, K., Krumm, B., Bagdasarian, M., and Hol, W.G.J. (2006) Structural and functional
12 studies of EpsC, a crucial component of the type 2 secretion system from *Vibrio*
13 *cholerae*. J Mol Biol **363**: 311-321.

14 Korotkov, K.V., and Hol, W.G.J. (2008) Structure of the GspK–GspI–GspJ complex from the
15 enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system. Nat Struct Mol Biol **15**: 462-
16 468.

17 Korotkov, K.V., Pardon, E., Steyaert, J., and Hol, W.G.J. (2009) Crystal structure of the N-
18 terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a
19 nanobody. Structure **17**: 255-265.

20 Korotkov, K.V., Johnson, T.L., Jobling, M.G., Pruneda, J., Pardon, E., Héroux, A., et al.
21 (2011) Structural and Functional Studies on the Interaction of GspC and GspD in the
22 Type II Secretion System. PloS Pathog **7**: e1002228.

23 Korotkov, K.V., Sandkvist, M., and Hol, W.G.J. (2012) The type II secretion system:
24 biogenesis, molecular architecture and mechanism. Nat Rev Microbiol **10**: 336-351.

25 Lallemand, M., Login, F.H., Guschinskaya, N., Pineau, C., Effantin, G., Robert, X., Shevchik,
26 V.E. (2013) Dynamic interplay between the periplasmic and transmembrane domains of
27 GspL and GspM in the type II secretion system. PLoS One **8**: e79562.

28 Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H.,
29 et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics **23**: 2947-2948.

30 Lindeberg, M., Salmond, G.P., and Collmer, A. (1996) Complementation of deletion
31 mutations in a cloned functional cluster of *Erwinia chrysanthemi* out genes with *Erwinia*
32 *carotovora* out homologues reveals OutC and OutD as candidate gatekeepers of species-
33 specific secretion of proteins via the type II pathway. Mol Microbiol **20**: 175-190.

- 1 Lindeberg, M., Boyd, C.M., Keen, N.T., and Collmer, A. (1998) External loops at the C
2 terminus of *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase C are required for species-specific
3 secretion through the Out type II pathway. *J Bacteriol* **180**: 1431-1437.
- 4 Login, F.H., and Shevchik, V.E. (2006) The single transmembrane segment drives self-
5 assembly of OutC and the formation of a functional Type II secretion system in *Erwinia*
6 *chrysanthemi*. *J Biol Chem* **281**: 33152-33162.
- 7 Login, F.H., Fries, M., Wang, X.H., Pickersgill, R.W., and Shevchik, V.E. (2010) A 20-
8 residue peptide of the inner membrane protein OutC mediates interaction with two
9 distinct sites of the outer membrane secretin OutD and is essential for the functional type
10 II secretion system in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol* **76**: 944-955.
- 11 Lu, H.M., and Lory, S. (1996) A specific targeting domain in mature exotoxin A is required
12 for its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J* **15**: 429-436.
- 13 Palomäki, T., Pickersgill, R., Riekk, R., Romantschuk, M., and Saarilahti, H.T. (2002) A
14 putative three-dimensional targeting motif of polygalacturonase (PehA), a protein
15 secreted through the type II (GSP) pathway in *Erwinia carotovora*. *Mol Microbiol* **43**: 585-
16 596.
- 17 Peabody, C.R., Chung, Y.J., Yen, M.R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A.P., and Saier, M.H.
18 (2003) Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal
19 flagella. *Microbiology* **149**: 3051-3072.
- 20 Possot, O.M., Vignon, G., Bomchil, N., Ebel, F., and Pugsley, A.P. (2000) Multiple
21 interactions between pullulanase secretin components involved in stabilization and
22 cytoplasmic membrane association of Pule. *J Bacteriol* **182**: 2142-2152.
- 23 Pugsley, A.P. (1992) Translocation of a folded protein across the outer membrane in
24 *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 12058-12062.
- 25 Py, B., Loiseau, L., and Barras, F. (2001) An inner membrane platform in the type II secretion
26 machinery of Gram-negative bacteria. *EMBO Rep* **2**: 244-248.
- 27 Reichow, S.L., Korotkov, K.V., Hol, W.G.J., and Gonen, T. (2010) Structure of the cholera
28 toxin secretion channel in its closed state. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1226-1233.
- 29 Rehman, S., Gu, S., Shevchik, V.E., and Pickersgill, R.W. (2013) Anatomy of secretin-
30 binding to the *Dickeya dadantii* type II secretion system pilotin. *Acta Cryst Section D* **69**:
31 1381-1386.
- 32 Remaut, H., and Waksman, G. (2006) Protein-protein interaction through β -strand addition.
33 *Trends Biochem Sci* **31**: 436-444.

- 1 Ryu, Y., and Schultz, P.G. (2006) Efficient incorporation of unnatural amino acids into
2 proteins in *Escherichia coli*. *Nat Methods* **3**: 263–265.
- 3 Sauvonnnet, N., and Pugsley, A.P. (1996) Identification of two regions of *Klebsiella oxytoca*
4 pullulanase that together are capable of promoting beta-lactamase secretion by the general
5 secretory pathway. *Mol Microbiol* **22**: 1-7.
- 6 Shevchik, V.E., Bortoli-German, I., Robert-Baudouy, J., Robinet, S., Barras, F., and
7 Condemine, G. (1995) Differential effect of *dsbA* and *dsbC* mutation on extracellular
8 enzyme secretion in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol* **16**: 745-753.
- 9 Shevchik, V.E., Robert-Baudouy, J., and Condemine, G. (1997a) Specific interaction between
10 OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of the general secretory
11 pathway, and secreted proteins. *EMBO J* **16**: 3007-3016.
- 12 Shevchik, V.E., Robert-Baudouy, J., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1997b) The pectate
13 lyase PelI of *Erwinia chrysanthemi* belongs to a new family. *J Bacteriol* **179**: 7321-7330.
- 14 Sippl, M.J., and Wiederstein, M. (2012) Detection of spatial correlations in protein structures
15 and molecular complexes. *Structure* **20**: 718–728.
- 16 Tonikian, R., Zhang, Y., Sazinsky, S.L., Currell, B., Yeh, J-H., Reva, B., et al. (2008) A
17 specificity map for the PDZ domain family. *PLoS Biol* **6**: e239.
18 doi:10.1371/journal.pbio.0060239.
- 19 Van der Meeren, R., Wen, Y., Van Gelder, P., Tommassen, J., Devreese, B., and Savvides,
20 S.N. (2013) New insights into the assembly of bacterial secretins: structural studies of the
21 periplasmic domain of XcpQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **288**: 1214–
22 1225.
- 23 Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.F., and Filloux, A. (2001)
24 Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II
25 pathway. *EMBO J* **20**: 6735-6741.
- 26 Wang, X., Pineau, C., Gu, S., Guschinskaya, N., Pickersgill, R.W., and Shevchik, V.E. (2012)
27 Cysteine scanning mutagenesis and disulfide mapping analysis of arrangement of GspC
28 and GspD protomers within the T2SS. *J Biol Chem* **287**: 19082-19093.
- 29 Yoder, M.D., Keen, N.T., and Jurnak, F. (1993) New domain motif: the structure of pectate
30 lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science* **260**: 1503-1507.

32 **Figure legends**

Fig. 1. Schematic representation of OutC (A), OutD (B) and their derivatives used in this study. The positions of domains are indicated with boxes: TMS, transmembrane segment; HR, Homology Region domain, PDB entry 2LNV (Gu et al., 2012a); PDZ domain, PDB entry 2I6V (Korotkov et al., 2006); N0 to N3, periplasmic OutD domains, PDB entry 3EZJ (Korotkov et al., 2009); S, S-domain, PDB entry 4K0U (Rehman et al., 2013). The size of some used derivatives does not correspond exactly to the domain boundaries, they were chosen because of the better stability and solubility.

Fig. 2. Loop3 of PelI is a part of the type II secretion signal. **A.** Top, PelI structure, PDB entry 3B4N (Creze et al., 2008). The loop 3 (G52 to R60) is shown in red. Bottom, schematics of some relevant PelI-Pel3 hybrids used in this study (in blue, PelI from *D. dadantii*; in red, Pel3 from *P. carotovorum*) and their secretion efficiencies (in right). **B.** Secretion efficiency of PelI/Pel3 hybrids (indicated on the top) was estimated in *D. dadantii* A5159 pelI strain, carrying a pBS plasmid with a chimeric pelI/pel3 gene. Culture supernatant (s) and cells (c) were analyzed by immunoblotting. The ratio of exoprotein in the culture supernatant reflects the efficiency of secretion. The native pectate lyases PelD and PelE were used as a positive control and the intracellular protein HrpW was used as a negative control. Asterisk shows a non-specific product. **C.** Sequence alignment of the Fn3 domains of PelI, Pel3 and their hybrids. Residues conserved in PelI and Pel3 are shown in black, residues specific for PelI are in blue and those for Pel3 are in red. Secretion efficiency of the hybrids is shown in the right column. The numbers (#) of hybrids are the same in (A), (B) and (C).

Fig. 3. Fn3 domain of PelI interacts with the periplasmic domains of OutC and OutD. **A** and **D.** Interactions of Fn3 with OutC (A) and OutD (D) analyzed by two-hybrid assay. The indicated periplasmic domains of OutC and OutD were fused to T25 while Fn3 was fused to T18 (as shown in Fig. S1) and combined in DHP1 cells. β -galactosidase activity (Miller units per milligram of bacteria) is the mean \pm SE of at least three independent experiments. It is

1 expressed as percentage of that with T25-OutC/T18-OutC (C/C, in black), used as positive
 2 control and considered as 100%. Histograms with Fn3-T18 are in grey and these with T18-
 3 Fn3 are in white. The dash line indicates background β -galactosidase measured in negative
 4 controls. **B** and **E**. Abundance of the interacting proteins in two-hybrid assay. An equivalent
 5 of 0.05 OD₆₀₀ of cell from cultures used for β -galactosidase measurements, in (A) and (D),
 6 was loaded on SDS-PAGE and then, probed with indicated antibodies. Positions of the
 7 fusions are indicated by arrows. Asterisk shows a non-specific product. The numbering of
 8 combinations is conserved in (A) and (B), and in (D) and (E). **C** and **F**. SPR studies of Fn3
 9 interaction with the PDZ domain of OutC (C) and the N0 and N1 domains of OutD (F). In
 10 sensorgrams, relative units (RU) are plotted as a function of time (sec). Bound ligand and
 11 soluble analyte are indicated at the top. The minimal and maximal concentrations of analyte,
 12 used in the experiments, are also shown along with the calculated dissociation constants (K_D).

13 **Fig. 4.** Specificity of the inter-domain interactions involving Fn3. **A** and **B**. The presence of
 14 the N1 domain improves the Fn3/PDZ interaction. **A**. In three-hybrid assay, the indicated
 15 OutD derivatives (lines 4 to 8) were coexpressed with the Fn3-T18/T25-PDZ pair in DHP1
 16 cells and assays were performed as in Fig. 3A, means \pm SE are shown, * $P < 0.01$. **B**.
 17 Abundance of the interacting proteins, in the three-hybrid assay. An equivalent of 0.05 OD₆₀₀
 18 of cell from cultures used for β -galactosidase measurements in (A) was loaded on SDS-PAGE
 19 and probed with indicated antibodies. **C** and **D**. PDZ of OutC could be involved in the
 20 recognition of the loop 3 of PelI. Interactions of the PDZ domain of OutC and the N domains
 21 of OutD with Fn3 domain of PelI (dark grey), Pel3 (white), or hybrid PelI(Lp) (grey) were
 22 analyzed by two-hybrid (C) and by immunoblotting (D). The numbering of combinations is
 23 conserved in (A) and (B), and in (C) and (D). Positions of the proteins are indicated by
 24 arrowheads. Asterisk shows a non-specific product.

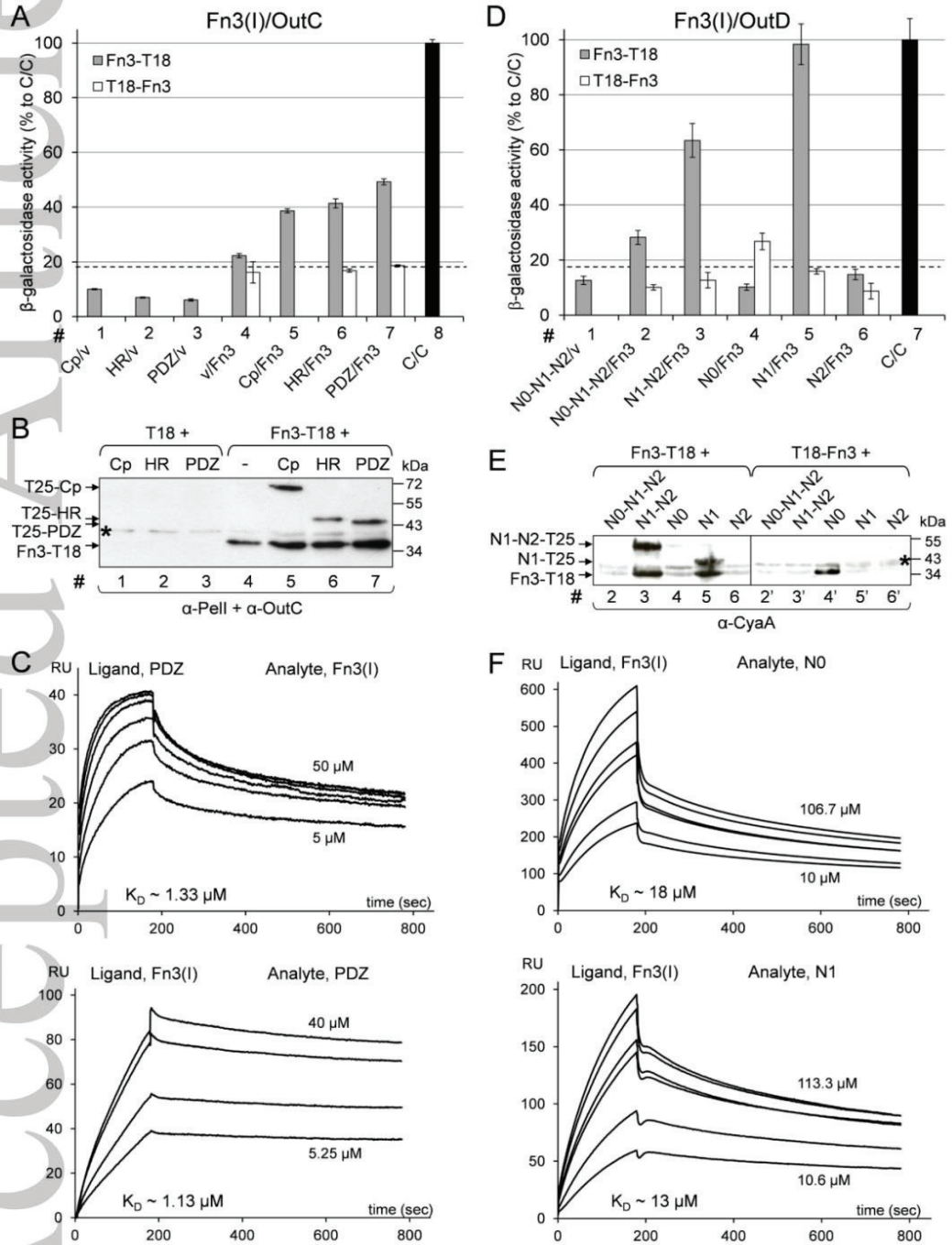
Fig. 5. OutC_{D-PDZ-P} improves secretion efficiency of PelI h13. **A.** Schematics of OutC derivatives: in grey, from *D. dadantii*; in white, from *P. carotovorum*. **B.** Immunodetection of plasmid-expressed OutC variants in *D. dadantii* wt strain. The position of the chromosomic OutC_D is indicated by an arrow and those of plasmid-expressed OutC variants are shown by a triangle. **C and D.** Secretion of the hybrid PelI (h13 and h14) and native pectinases, PelD and PemaA, in the presence of exogenous OutC variants, in *D. dadantii* A5588 Δ outC pelI (C) and pelI A5159 (D) strains. Pectinases were immunodetected in supernatants (s) and cell extracts (c) of bacteria expressing an exogenous outC allele from a pTdB plasmid (indicated on the top) and either PelI h13 or PelI h14 from a pBAD plasmid. The pectin methylesterase PemaA was used as a positive control; its secretion is not dependent on the PDZ domain. BlaM was used as a negative control.

Fig. 6. Multiple sequence alignments of pectate lyases from *D. dadantii* and *P. carotovorum* along with potential secretion signals. **A.** Pectate lyases that consist of two domains, Fn3 and catalytic: PelI from *D. dadantii* (PDB 3B4N) and Pel3 from *P. carotovorum* (UniProt Q47465). **B.** Pectate lyases with only a catalytic domain: PelC from *D. dadantii* EC16 (PDB 2PEC), PelB from *D. dadantii* 3937 (UniProt E0SJQ6), PelC from *P. carotovorum* (UniProt P0C1C3), PelA from *D. dadantii* EC16 (PDB 1JRG) and PelE from *D. dadantii* EC16 (PDB 1PCL). Sequence alignment was performed with Clustal (Larkin et al, 2007) and manually optimized with DaliLite (Holm and Park, 2000). The residue numbering is for *D. dadantii* 3937 PelI, in (A), and for *D. dadantii* EC16 PelC or 3937 PelB, in (B). Secondary structure elements of known structures were extracted with DSSP (Kabsch and Sander, 1983) and shown above the alignments: these of the Fn3 domain and the N-terminal extension are shown in pink, while those of the catalytic domains are in black. Strictly and less-conserved residues are indicated with a red and yellow background, respectively. The query sequence, loop 3/ β -strand 4 of the Fn3 domain of PelI (residues G52 to V65), and the putative secretion motifs

1 identified by TopMatch in the target sequences are indicated with cyan letters. The residues of
 2 PelI and PelB substituted in this study are indicated with orange triangles. The analyzed
 3 pectate lyases belong to three homologous groups: PelI/Pel3, PelC/PelB and PelA/PelE.
 4 Sequence identity is greater than 60% within each group and it is lower than 20% between
 5 them. The figure was prepared with ESPript (Gouet et al., 2003).
 6 **Fig. 7.** Site-specific photo-cross-linking of PelI in *D. dadantii*. A3776 (**A** and **B**) or A5588
 7 (**C**) cells carrying pSup-BpaRS-6TRN and pTdB-PLI-oCDS harboring an amber codon at the
 8 indicated position of PelI were grown in M9 medium containing pBPA and galacturonate.
 9 After 8 h of growth, the cells were UV-irradiated (+) or untreated (-), loaded on 9% Tris-
 10 Glycin-6 M urea SDS PAGE (A and B) or on 5-12% Tris-Acetate SDS PAGE (C) and
 11 analyzed by immunoblotting with indicated antisera. The positions of PelI and Out proteins
 12 are shown by arrows and these of PelI-OutC and PelI-OutD complexes are shown by filled
 13 and open triangles, respectively. Non-specific specie reactive with antisera are shown by
 14 asterisks. Dots indicate non-characterized PelI adducts.

15

1



2

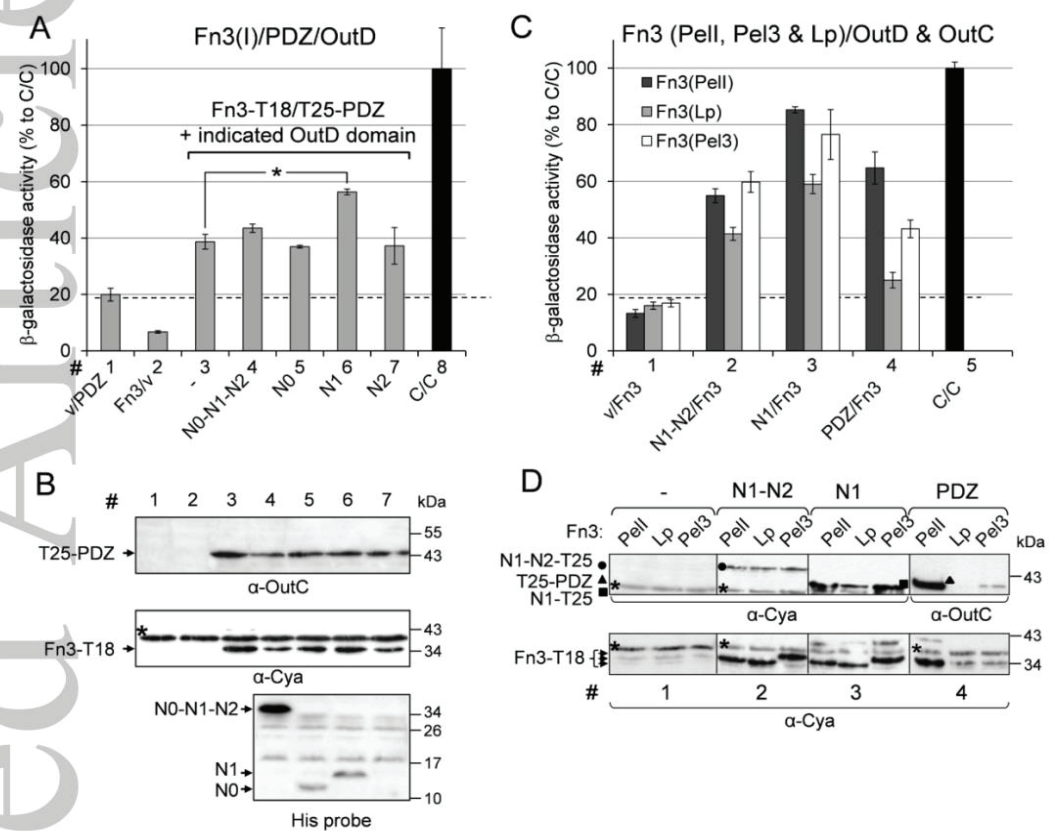
3

mmi_12744_f3

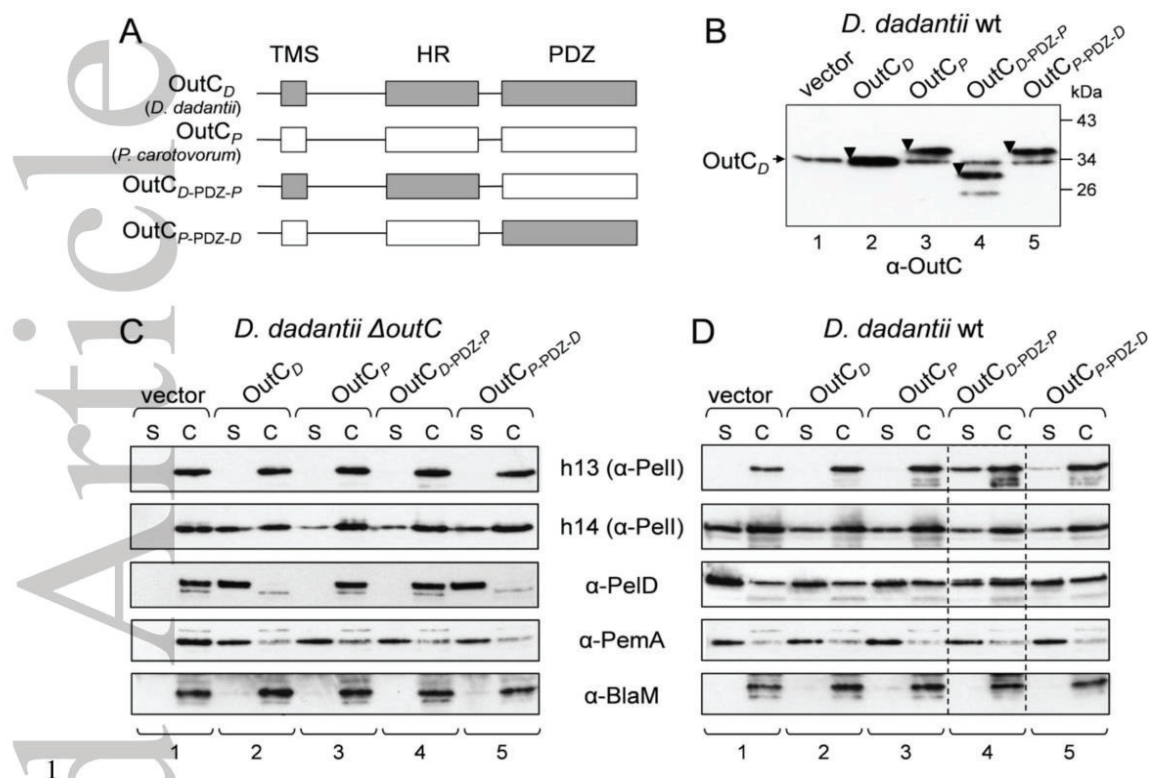
33

This article is protected by copyright. All rights reserved.

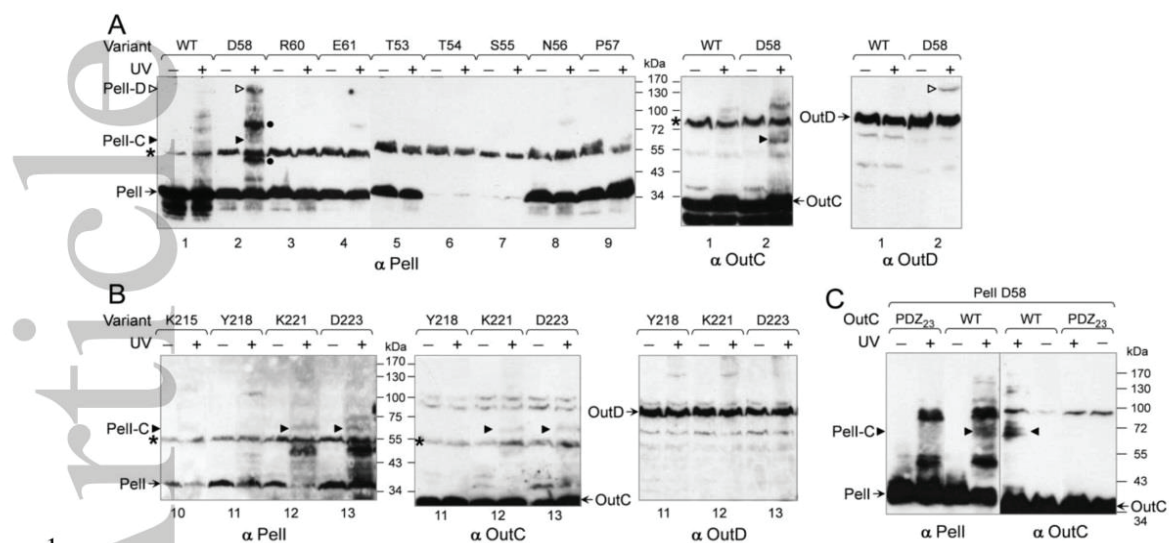
235



mmi_12744_f4



mmi_12744_f5



mmi_12744_f7

Supporting Information

Substrate recognition by the bacterial type II secretion system: more than a simple interaction.

Camille Pineau^{1,2,3}, Natalia Guschinskaya^{1,3}, Xavier Robert⁴, Patrice Gouet⁴, Lionel Ballut^{4*}
and Vladimir E. Shevchik^{1,2,3*}

¹Université Lyon 1, F-69622 Lyon, France.

²INSA-Lyon, F-69621 Villeurbanne, France.

³CNRS, UMR5240, Microbiologie Adaptation et Pathogénie, F-69622 Lyon, France.

⁴Laboratory for Biocrystallography and Structural Biology of Therapeutic Targets, Molecular and Structural Bases of Infectious Diseases, CNRS UMR5086, F-69367, Lyon, France

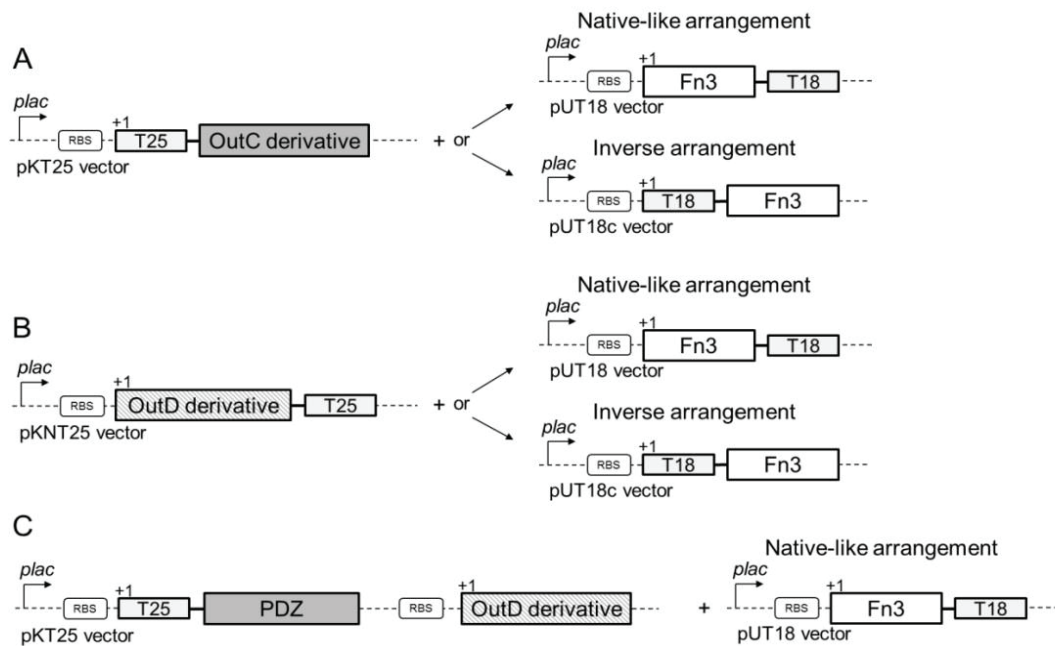


Fig. S1 Schematic representation of the derivatives used in two hybrid experiments. **A.** To analyze OutC/Fn3 interactions, an appropriate OutC derivative (Cp, HR or PDZ) was fused to the C-terminus of the T25 subunit (on pKT25 vector) and combined with pUT18C or pUT18 plasmid (shown on right) carrying the Fn3 domain fused to either N- or C-terminus of T18, referred to as native-like and inverse arrangement, respectively. **B.** To analyze OutD/Fn3 interactions, an appropriate OutD derivative (shown in Fig. 1B) was fused to the N-terminus of the T25 subunit and combined with pUT18C or pUT18 plasmid carrying the Fn3 domain fused to T18. **C.** To analyze the impact of the presence of OutD domains on the PDZ/Fn3 interaction, an appropriate OutD derivative was coexpressed with the T25-PDZ fusion from the same pKT25 plasmid under control of the Plac promoter. This plasmid was next combined with a pUT18 plasmid carrying the Fn3-T18 fusion (shown on right).

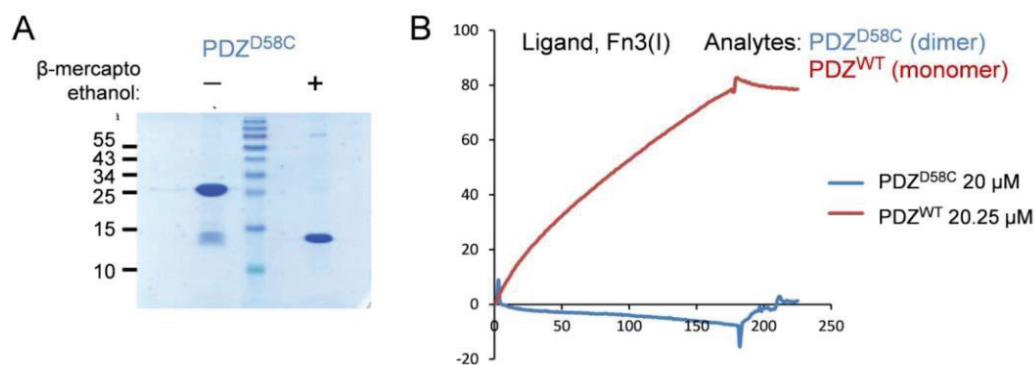


Fig. S2 Artificial dimerization of the PDZ domain prevents its interaction with Fn3(I).

A. Introduction of the D160C substitution just before the PDZ domain generates a dimeric PDZ derivative. Electrophoretic mobility of the PDZ^{D58C} derivative was compared in non-reducing (β-mercaptoethanol -) and reducing (β-mercaptoethanol +) conditions demonstrating that the protein is dimeric. **B.** SPR sensorgram of Fn3(I) interaction with the PDZ domain of OutC. Fn3(I) was immobilized onto CM5 chip at 250 μg/ml in 10 mM sodium acetate, pH 4.5 via amine coupling at a flow rate of 5 μl/min. A control flow-cell was submitted to the coupling steps, the protein being omitted. Next, the indicated concentrations of PDZ^{WT} and PDZ^{D58C} derivatives were injected at 30 μl/min at 25°C.

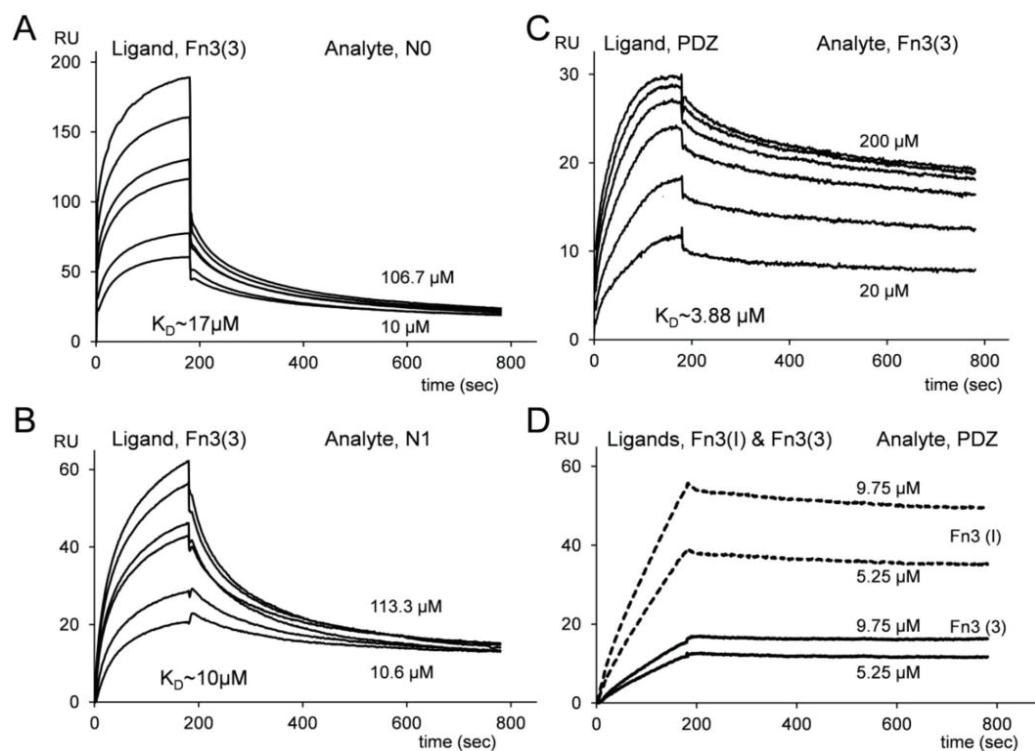


Fig. S3 SPR studies of interactions of Fn3 domain of Pel3 of *P. carotovorum* with the periplasmic domains of OutD (**A, B**) and OutC (**C, D**) of *D. dadantii*. In sensorgrams, relative units (RU) are plotted as a function of time (sec). Bound ligand and soluble analyte are indicated at the top. The minimal and maximal concentrations of analyte, used in the experiments, are also shown along with the calculated dissociation constants (K_D). In (**D**), sensorgrams collected with the Fn3 domain of PelI are shown with dotted lines.

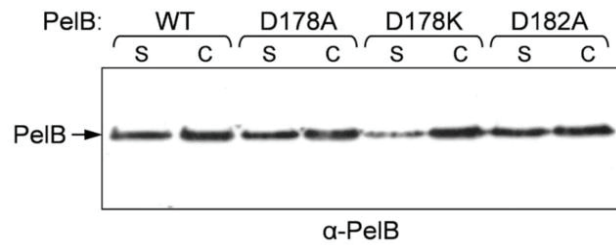


Fig. S4 Secretion efficiency of PelB variants (indicated on top) was estimated by immunodetection in culture supernatant (s) and cell extract (c) of *D. dadantii* pelB pelC A3768 strain carrying an appropriate pTPLB plasmid and grown in LB supplemented with sodium galacturonate. The quantity of PelB variant in the culture supernatant reflects the efficiency of its secretion.

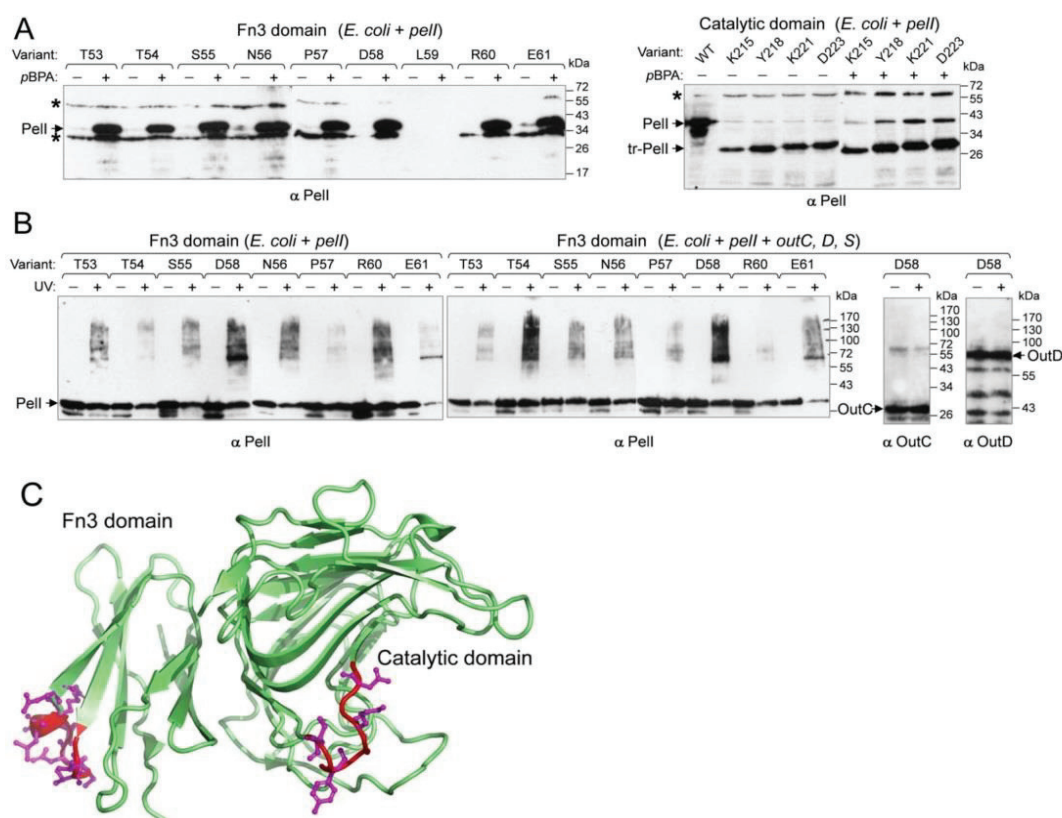


Fig. S5 Expression and photo-cross-linking of PelI variants carrying pBPA in *E. coli*. **A.** Specificity of pBPA incorporation. *E. coli* MC4100 cells carrying pSup-BpaRS-6TRN and pBS-PLI harboring an amber codon at the indicated position were grown overnight in M9 medium containing 0.4 % glucose and supplemented (+) or not (-) with 1 mM pBPA and then, they were analyzed by immunoblotting with PelI-antibodies. **B.** UV-cross-linking of pBPA containing PelI variants in *E. coli*. MC4100 cells carrying pSup-BpaRS-6TRN together with pBS-PLI (left) or pTdB-PLI-oCDS (right) were grown in M9 medium containing pBPA and glucose. After 8 h of growth, the cells were UV-irradiated (+) or untreated (-) and analyzed by immunoblotting with PelI, OutC and OutD antisera. **C.** PelI structure showing the location of substituted residues.

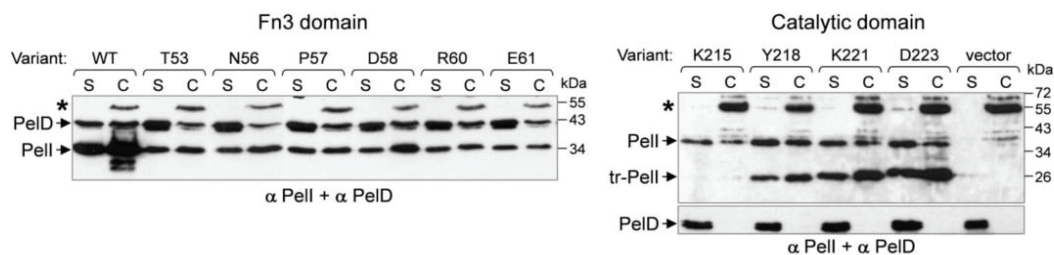


Fig. S6 Secretion efficiency of PelI variants carrying pBPA. *D. dadantii* A3776 cells carrying pSup-BpaRS-6TRN and pTdB-PLI-oCDS harboring an amber codon at the indicated position were grown in M9 medium containing 1 mM pBPA, 0.4 % glycerol and 0.2 % sodium galacturonate to induce synthesis of pectinases and Out proteins. After 8 h of growth, the culture supernatant (s) and cells (c) were analyzed by immunoblotting with PelI and PelD-antibodies. Truncated forms of PelI that resulted from translation termination at the amber codon are indicated as tr-PelI. Non-specific species are shown by asterisks.

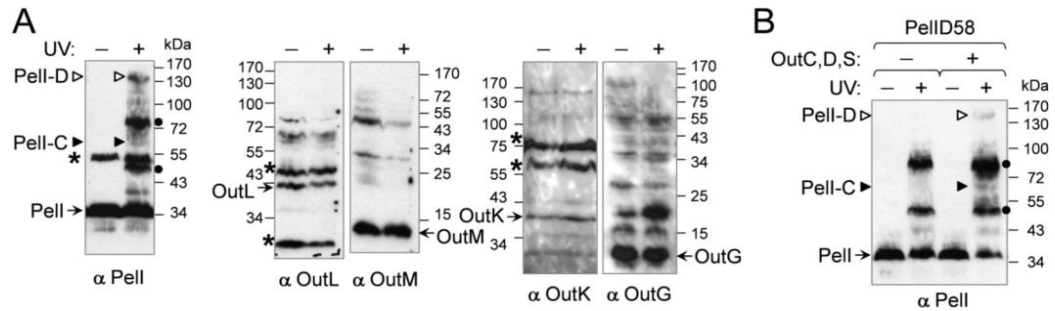


Fig. S7 Specificity of site-specific photo-cross-linking in *D. dadantii*. **A.** A3756 cells carrying pSup-BpaRS-6TRN and pTdB-PLID58TAG-oCDS were grown in M9 medium containing pBPA and galacturonate. After 8 h of growth, the cells were UV-irradiated (+) or not (-), loaded on SDS PAGE and analyzed by immunoblotting with indicated antisera. The positions of PelI and Out proteins are shown by arrows and these of PelI-OutC and PelI-OutD complexes are shown by filled and open triangles, respectively. Non-specific specie reactive with antisera are shown by asterisks. Dots indicate non-characterized PelI adducts. **B.** A5588 cells carrying pSup-BpaRS-6TRN and either pTdB-PLID58TAG or pTdB-PLID58TAG-oCDS were grown, cross-linked and analyzed as in **A.** with PelI antibodies.

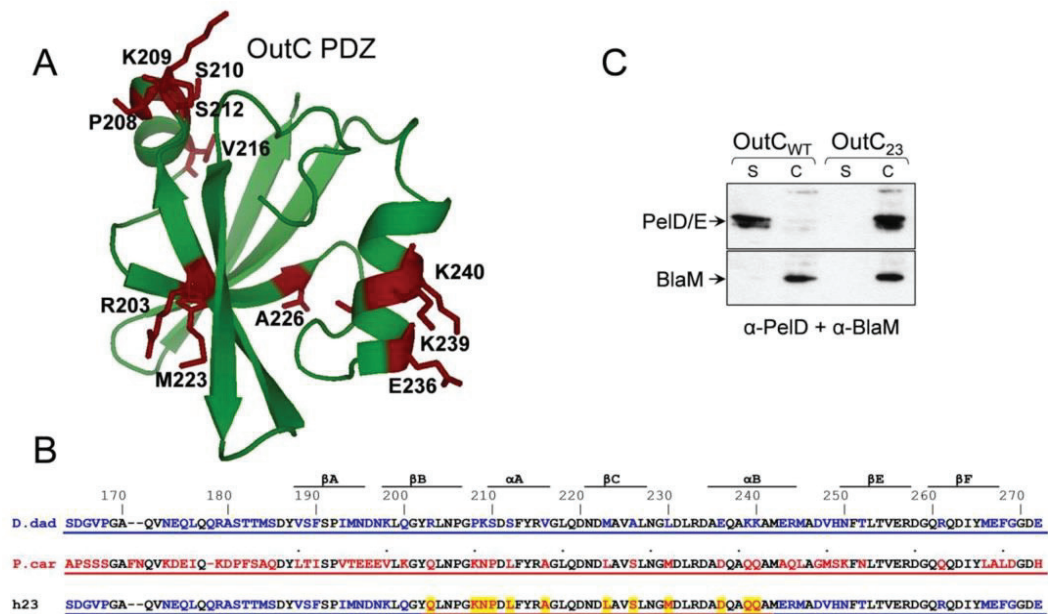


Fig. S8. Schematic representation and properties of the OutC PDZ-h23 variant. **A.** The residues in the PDZ domain of OutC of *D. dadantii* that were substituted with their counterpart from the *P. carotovorum* PDZ domain are shown in red sticks. **B.** Sequence alignment of the PDZ domains of OutC from *D. dadantii* (in blue), *P. carotovorum* (in red) and the hybrid OutC-h23. The residues substituted in h23 are highlighted in yellow. **C.** Secretion efficiency was estimated in *D. dadantii* A5588 Δ outC strain, carrying a pTdB-PLI-oCDS plasmid with the wild-type or hybrid outC gene. Culture supernatant (s) and cells (c) were analyzed by immunoblotting with antibody raised against PelD, which cross-react also with PelE (62% of amino acid identity) and with BlaM-antibody, used as a negative control. The ratio of exoprotein in the culture supernatant reflects the efficiency of secretion.

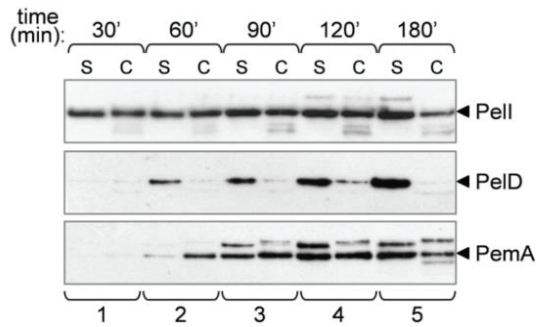


Fig. S9. Secretion kinetics of the various *D. dadantii* pectinases. *D. dadantii* pelI A5159 cells carrying a pBS-PLI plasmid were grown in LB to an OD₆₀₀ of 0.5. Then, the expression of out and pectinase genes was induced by adding of galacturonate. Culture samples were taken 30 to 180 min afterwards and pectinase content in supernatants (s) and cells (c) was assessed by immunodetection. The position of pectinases is shown by a triangle.

Table S1. Chi-square values obtained for different kinetic models in SPR experiments.

Number #	1	2	3	4	5	6	7
Figure	3C	3C	3F	3F	S2A	S2B	S2C
Ligand	PDZ	Fn3(I)	Fn3(I)	Fn3(I)	Fn3(3)	Fn3(3)	PDZ
Analyte	Fn3(I)	PDZ	N0	N1	N0	N1	Fn3(3)
Chi2 1:1	1.32	4.6	77	6.87	44.3	3.9	0.224
Chi2 bivalent	0.548	21.1	16.5	11.9	2.89	11.9	4.68
Chi2 two state	0.617	0.309	21.2	3.87	3.36	3.87	0.151

Chi2 obtained for a simple 1:1 model is high for interactions #3 and #5. For interactions #1, #2, #4, #6 and #7, visual inspection indicated that the fits are not correct. For the latter interactions, kinetic constant k_a is approaching or overrunning the limit that can be measured by the instrument. Together these indicate that a simple 1:1 model is not well appropriate in these cases. Models with heterogeneous ligand or analyte were also considered but the SPR data did not fit with these models and the results are not presented here.

The best Chi2 was obtained with a two state model for interactions #2, #4, #6 and #7. For interactions #1, #3 and #5 two state reaction and bivalent model were very close. We decided to keep the same, two-state model, as a bone fide model, for all these interactions since the two-state reaction model could be better consistent with the actual mode of substrate recognition by the T2SS, it suggests a change in the conformation during the first, fast interaction step.

Table S2. Bacterial strains used in this study

Plasmid	Genotype/phenotype	Reference
Escherichia coli		
BL21(DE3)	F ⁻ dcm ompT hsdSB (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal lon λ</i> (DE3)	Stratagene
DHP1	F ⁻ <i>cya glnV44(AS) recA1 endA1 gyrA96 (Nal^R) thi1</i> <i>hsdR17 spoT1 rfbD1</i>	Karimova et al., 1998
NM522	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (r_K⁻ m_K⁺)</i> [F' <i>proAB lacI^qΔM15</i>]	Stratagene
MC4100	F ⁻ <i>araD139 deoC1 flbB5301 ptsF25 rbsR relA1 rpsL150</i> <i>Δ(argF-lac)U169</i>	Casadaban, 1976
Dickeya dadantii		
A3768	<i>lacZ2 pelBC::uidA-nptI (Km^R)</i>	This work
A3756	<i>lacZ2 pelI:: uidA-nptI (Km^R)</i>	This work
A3776	<i>lacZ2 ΔoutC pelI:: uidA-nptI (Km^R) kdgR::Tntet</i>	This work
A5159	<i>lacZ2 pelI::cat (Cm^R)</i>	This work
A5413	<i>lacZ2 ΔoutC pelI(Lp)</i>	This work
A5522	<i>lacZ2 pelI::cat (Cm^R) kdgK</i>	This work
A5588	<i>lacZ2 ΔoutC pelI::cat (Cm^R)</i>	This work

Table S3. Plasmids used in this study

Plasmid	Genotype/phenotype	Reference
Vectors for secretion assays		
pBS	Bluescript KS+, Ap ^R	Stratagene
pBS-PLI	pBS/KS carrying pelI of <i>D. dadantii</i>	Bouley et al, 2001
pBS-PL3	pBS/KS carrying pel3 of <i>P. carotovorum</i>	Bouley et al, 2001
pBS-Fn3(I)-Cat(3)	pBS/KS carrying a chimeric pelI-pel3 encoding residues 1-109 from PelI and 110-347 from Pel3	This work
pBS-Fn3(3)-Cat(I)	pBS/KS carrying a chimeric pel3-pelI encoding residues 1-108 from Pel3 and 110-344 from PelI	This work
pBS-h13	pBS/KS carrying a chimeric pel3-pelI encoding residues 1-65 from Pel3 and 66-344 from PelI	This work
pBS-h13(E65V-K62R)	pBS-h13 with the double mutation K62R and E65V	This work
pBS-h19	pBS/KS carrying a chimeric pelI-pel3 encoding residues 1-56 from Pel3 and 57-344 from PelI	This work
pBS-h14	pBS/KS carrying a chimeric pelI-pel3 encoding residues 1-51 from Pel3 and 52-344 from PelI	This work
pBS-h14(G52S)	pBS-h14 with the point substitution G52S	This work
pBS-h14(N56A)	pBS-h14 with the point substitution N56A	This work
pBS-h14(R62K-V65E)	pBS-h14 with the double substitution R62K and V65E	This work
pBS-h23	pBS/KS carrying a chimeric pelI-pel3 encoding residues 1-55 from h14 (N56A) and 56-344 from h13 (E65V-K62R)	This work
pBS-PLI(Lp)	pBS/KS carrying a chimeric pelI-pel3 encoding residues 1-51 from PelI, 52-60 from Pel3 and 61-344 from PelI	This work
pBS-PLI(D58A)	pBS-PLI with the point mutation D58A	This work
pBAD18	expression vector containing arabinose-inducible P _{BAD} promoter, Km ^R	Guzman et al, 1995
pBAD-h13	pBAD18 carrying a chimeric pel3-pelI encoding residues 1-65 from Pel3 and 66-344 from PelI under control of P _{BAD}	This work
pBAD-h14	pBAD18 carrying a chimeric pelI-pel3 encoding residues 1-51 from Pel3 and 52-344 from PelI under control of P _{BAD}	This work
pTdB	pT7-6 carrying galacturonate-inducible promoter PpelC	Bouley et al, 2001
pTdB-oC _D	pT7-6 carrying outC _{D.dat} under control of PpelC	Bouley et al, 2001
pTdB-oC _P	pT7-6 carrying outC _{P.car} under control of PpelC	Bouley et al, 2001
pTdB-oC _{D-PDZ-P}	pT7-6 carrying outC _{D.dat1-168/P.car} under control of PpelC	This work
pTdB-oC _{P-PDZ-D}	pT7-6 carrying outC _{P.car1-184/D.dat} under control of PpelC	Bouley et al, 2001
pTPLB	pT7-6 carrying pelB of <i>D. dadantii</i>	Shevchik et al, 1997
pTPLB(D178A)	pTPLB with the point substitution D178A	This work
pTPLB(D178K)	pTPLB with the point substitution D178K	This work
pTPLB(D182A)	pTPLB with the point substitution D182A	This work
Two-hybrid vectors		
pKT25	pSU40 derivative encoding T25 fragment of CyaA upstream of a multicloning site, Km ^R	Karimova et al, 1998
pKNT25	pSU40 derivative encoding T25 fragment of CyaA	Karimova et al, 1998

pUT18C	downstream of a multicloning site, Km ^R pUC19 derivative encoding T18 fragment of CyaA upstream of a multicloning site, Ap ^R	Karimova et al,1998
pUT18	pUC19 derivative encoding T18 fragment of CyaA downstream of a multicloning site, Ap ^R	Karimova et al,1998
pKT25-oC	pKT25 carrying T25-outC(residues 2-272)	Login & Shevchik, 2006
pKT25-oCp	pKT25 carrying T25-outC (residues 41-272)	Login & Shevchik, 2006
pKT25-HR	pKT25 carrying T25-outC (residues 41-168)	This work
pKT25-PDZ	pKT25 carrying T25-outC (residues 161-272)	Login & Shevchik, 2006
pKNT25-N0N1N2	pKNT25 carrying outD-T25 (residues 28-286)	Login et al., 2010
pKNT25-N1N2	pKNT25 carrying outD-T25 (residues 116-286)	This work
pKNT25-N0	pKNT25 carrying outD-T25 (residues 28-113)	This work
pKNT25-N1	pKNT25 carrying outD-T25 (residues 116-221)	This work
pKNT25-N2	pKNT25 carrying outD-T25 (residues 192-286)	This work
pKT25-PDZ-N0N1N2	pKT25 coexpressing T25-outC (residues 161-272) and outD (residues 28-286) fused to 6His	This work
pKT25-PDZ-N0	pKT25 coexpressing T25-outC (residues 161-272) and outD (residues 28-113) fused to 6His	This work
pKT25-PDZ-N1	pKT25 coexpressing T25-outC (residues 161-272) and outD (residues 116-221) fused to 6His	This work
pKT25-PDZ-N2	pKT25 coexpressing T25-outC (residues 161-272) and outD (residues 192-286) fused to 6His	This work
pUT18-Fn3(I)	pUT18 carrying pelI-T18 (residues 20-115)	This work
pUT18-Fn3(Lp)	pUT18 carrying pelI(Lp)-T18 coding residues 20-51 from PelI, 52-60 from Pel3 and 61-115 from PelI	This work
pUT18-Fn3(3)	pUT18 carrying pel3-T18 (residues 22-117)	This work
pUT18C-Fn3(I)	pUT18C carrying T18-pelI (residues 20-115)	This work
pUT18C-OutC	pUT18C carrying T18-outC (residues 2-272)	Login & Shevchik, 2006
Protein production vectors (SPR assay)		
pET-20b(+)	Signal sequence and 6His-tag fusion vector, Ap ^R	Novagen
pET20-Fn3(I)	pET20(+) carrying pelI (residues 20-115) fused to 6His	This work
pET20-Fn3(3)	pET20(+) carrying pel3 (residues 22-117) fused to 6His	This work
pGEX-6P-3	GST-fusion vector with PreScission protease site, Ap ^R	GE Healthcare
pGX-HR	pGEX-6P-3 carrying outC (residues 41-162) fused to GST	This work
pGX-PDZ	pGEX-6P-3 carrying outC (residues 162-272) fused to GST	This work
pET20-N0	pET-20b(+) carrying outD (residues 28-112) fused to 6His	Login et al, 2010
pET20-N1	pET-20b(+) carrying outD (residues 116-221) fused to 6His	Login et al, 2010
Site-specific photo-cross-linking vectors		
pSup-BpaRS-6TRN	p15A-based plasmid encodes 6 copies orthogonal tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase permitting ribosomal incorporation of pBPA at TAG stop codons, Cm ^R	Ryu & Schultz, 2006
pBS-PLI(T53tag)	pBS-PLI with the point mutation T53TAG	This work
pBS-PLI(T54tag)	pBS-PLI with the point mutation T54TAG	This work
pBS-PLI(S55tag)	pBS-PLI with the point mutation S55TAG	This work
pBS-PLI(N56tag)	pBS-PLI with the point mutation N56TAG	This work
pBS-PLI(P57tag)	pBS-PLI with the point mutation P57TAG	This work

pBS-PLI(D58tag)	pBS-PLI with the point mutation D58TAG	This work
pBS-PLI(L59tag)	pBS-PLI with the point mutation L59TAG	This work
pBS-PLI(R60tag)	pBS-PLI with the point mutation R60TAG	This work
pBS-PLI(E61tag)	pBS-PLI with the point mutation E61TAG	This work
pTdB-oCD	pT7-6 carrying outC and outD of <i>D. dadantii</i> under control of PpelC	Wang et al, 2012
pTdB-PLI	pT7-6 carrying p _{ell} under control of PpelC	This work
pTdB-oCDS	pTdB-oCD carrying also outS of <i>D. dadantii</i>	This work
pTdB-PLI-oCDS	pTdB-oCDS carrying also p _{ell} of <i>D. dadantii</i>	This work
pTdB-PLI(T53tag)-oCDS	pTdB-oCDS carrying p _{ell} (T53TAG)	This work
pTdB-PLI(T54tag)-oCDS	pTdB-oCDS carrying p _{ell} (T54TAG)	This work
pTdB-PLI(S55tag)-oCDS	pTdB-oCDS carrying p _{ell} (S55TAG)	This work
pTdB-PLI(N56tag)-oCDS	pTdB-oCDS carrying p _{ell} (N56TAG)	This work
pTdB-PLI(P57tag)-oCDS	pTdB-oCDS carrying p _{ell} (P57TAG)	This work
pTdB-PLI(D58tag)-oCDS	pTdB-oCDS carrying p _{ell} (D58TAG)	This work
pTdB-PLI(R60tag)-oCDS	pTdB-oCDS carrying p _{ell} (R60TAG)	This work
pTdB-PLI(E61tag)-oCDS	pTdB-oCDS carrying p _{ell} (E61TAG)	This work
pTdB-PLI(K215tag)-oCDS	pTdB-oCDS carrying p _{ell} (K215TAG)	This work
pTdB-PLI(Y218tag)-oCDS	pTdB-oCDS carrying p _{ell} (Y218TAG)	This work
pTdB-PLI(K221tag)-oCDS	pTdB-oCDS carrying p _{ell} (K221TAG)	This work
pTdB-PLI(D223tag)-oCDS	pTdB-oCDS carrying p _{ell} (D223TAG)	This work
pTdB-PLI(D58tag)-oC _{H23} DS	pTdB-PLI(D58TAG)-oCDS carrying outC _{H23}	This work

Table S4. Primers employed in the study

Primer	Nucleotide sequence (5'-3') ^b	Generated mutation
h13_E65V ^a	ggcagcgaaaaaatcgagtgctcgacgcggaaacccgtacc	Fn3(h13)E65V
h13_E65VK62R ^a	aggcaggcagcgaaagaatcgagtgctcgacgcggaaacc	Fn3(h13)E65VK62R
h14_G52S ^a	gttcgccaggatgtttatcgagcactaccagcaaccctgacc	Fn3(h14)G51S
h14_N56A ^a	cgcggcactaccagcgctcctgacctgacctgcg	Fn3(h14)N56A
h14_R62K ^a	gcaaccctgacctgcgtgaaaagatcgccgtgctggacgcggaaacc	Fn3(h14)R62K
h14_V65E ^a	cctgcgtgaacgtatcgccgagctggacgcggaaacccg	Fn3(h14)V65E
PLI_D58A ^a	cggcactaccagcaaccctgcccgtgacgtatcgccg	Fn3(PelI)D58C
PLB_D178A ^a	cggcgccaacctgaatgcggcgacggcgacggcgacacc	PelBD178A
PLB_D178K ^a	cggcgccaacctgaatgcaaggcgacggcgacggcgacacc	PelBD178K
PLB_D182A ^a	ccatgaatgcgacggcgacggcgccggcgacaccacctttgaggcc	PelBD182A
OuC	ggttggtttgcgcgatgc	
rcOuD	ggtgaccatttcacgatcg	
HIHI-PP-NtGST	ccaagcttcggatctggaagtctgttccagggggccctgggatccatgtcccctatactaggtattgg	
CtGST-Stp-Xho	ccatcctccaaaatcggttaactcgag	
5'NdepelI	ggagatatacatatggcccaaacacactg	
3'NtpelIHIHI	gcaagcttcgctgcgcgcagcggggcc	
5'HIHIpelI	gccaaagcttgcccaaacacacactgatgct	
3'NtpelIERI	gctgaattcgctgcgcgcagcggggcc	
5'Ndepel3	tacatatggatgacaccatgctgatgctgc	
3'Ntpel36hisBHI	tcggatccttagtgatggtgatggtgatgaagcggcgctgcacg	
5'HIHIpel3	tatcaagcttgatgacaccatgctgatgctg	
3'Ntpel3ERI	ggctgaattcagcggcgctgcacgtaatgg	
5'SacIOuS	gagctcacgcacgtgcgcttc	
3'EcoRIOuS	gaattctgcacatcatgcagt	
PLI_T53TAG ^a	gtcagggaagtttatcgcgctagaccagcaaccctgacctgc	Fn3(PelI)T53TAG
PLI_T54TAG ^a	cagggaagtttatcgcgccacttagagcaaccctgacctgcgtc	Fn3(PelI)T54TAG
PLI_S55TAG ^a	gaagtttatcgcgccactacctagaaccctgacctgcgtgaac	Fn3(PelI)S55TAG
PLI_N56TAG ^a	ggaagtttatcgcgccacttagcctgcgtgaacgtatcgccg	Fn3(PelI)N56TAG
PLI_P57TAG ^a	cgcggcactaccagcaactaggacctgcgtgaacgtatc	Fn3(PelI)P57TAG
PLI_D58TAG ^a	cggcactaccagcaacccttagctgcgtgaacgtatcgccg	Fn3(PelI)D58TAG
PLI_L59TAG ^a	cactaccagcaaccctgactagcgtgaacgtatcgccgtg	Fn3(PelI)L59TAG
PLI_R60TAG ^a	ctaccagcaaccctgacctgtaggaacgtatcgccgtggacg	Fn3(PelI)R60TAG

PLI_E61TAG ^a	cagcaaccctgaccctgcgt tag cgatcgccgtggacgcggaac	Fn3(PelI)E61TAG
PLI_K214TAG ^a	cgggatcgcgcataacgcct tag gacgggtatggcggcaaaccggac	PelIK214TAG
PLI_Y217TAG ^a	gcataacgccaagacggtag ggc ggcaaaccggacaaagtg	PelIY217TAG
PLI_K220TAG ^a	caaagacgggtatggcgg ctag ccggacaaagtgtgcagcac	PelIK220TAG
PLI_D222TAG ^a	gacgggtatggcggcaaacc gtag aaagtgtgcagcacaattc	PelID222TAG
OuC_Q171TAA ^a	cggacggcggtcctggcgc cta gtcaacgagcttcagc	OutCQ171TAA

^a For each primers used in site directed mutagenesis, another primer with reverse complementary sequence was used (not shown).

^b Mutated or introduced bases are in bold.

SI Material and Methods

Plasmid constructions

To create plasmids expressing the Fn3 domain of PelI (residues 20-115), the corresponding pelI sequence was amplified using 5'NdepelI and 3'NtpelIHIII or 5'HIIPelI and 3'NtpelIERI primers. The resulting fragments were cloned into the NdeI/HindIII sites of pET20b(+) or into the HindIII/EcoRI sites of pUT18, respectively, to create in frame fusion with T18. Similarly, to generate plasmids expressing the Fn3 domain of Pel3 (residues 22-117), the primer pairs 5'Ndepel3 / 3'Ntpel36hisBHI and 5'HIIPel3 / 3'Ntpel3ERI were used.

To create two-hybrid plasmids co-expressing the T25-PDZ fusion with various OutD-6His derivatives (Supplementary Figure S1), an appropriate 'outC- 'outD' gene fragment was subcloned from a suitable pGX-oC-oD plasmid (Login et al, 2010) into pKT25 vector. In these plasmids, an XbaI site, covering an amber stop codon at the end of outC, was engineered. Next, an XbaI/NdeI fragment, carrying an RBS from pET20b(+) vector, was introduced after outC and an appropriate NdeI/SspI sequence coding for an OutD-6His derivative was cloned behind it.

To generate pTdB-oCDS plasmid, the outS *D. dadantii* 3937 gene was amplified, using 5'SacIOuS and 3'EcoRIOuS primers, and cloned into SacI/EcoRI sites of pTdB-oCD plasmid. To create pTdB-PLI-oCDS plasmid, the HindIII/XbaI pelI fragment from pBS-PLI plasmid was cloned into the HindIII/XbaI sites of pTdB-oCDS plasmid.



Microbiology:
**Cysteine Scanning Mutagenesis and
 Disulfide Mapping Analysis of
 Arrangement of GspC and GspD
 Protomers within the Type 2 Secretion
 System**



Xiaohui Wang, Camille Pineau, Shuang Gu,
 Natalia Guschinskaya, Richard W. Pickersgill
 and Vladimir E. Shevchik
J. Biol. Chem. 2012, 287:19082-19093.
 doi: 10.1074/jbc.M112.346338 originally published online April 20, 2012

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M112.346338](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.346338)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](#).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

Supplemental material:

<http://www.jbc.org/content/suppl/2012/04/20/M112.346338.DC1.html>

This article cites 44 references, 16 of which can be accessed free at
<http://www.jbc.org/content/287/23/19082.full.html#ref-list-1>

Cysteine Scanning Mutagenesis and Disulfide Mapping Analysis of Arrangement of GspC and GspD Protomers within the Type 2 Secretion System^{*,§}

Received for publication, January 25, 2012, and in revised form, March 28, 2012. Published, JBC Papers in Press, April 20, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.346338

Xiaohui Wang[‡], Camille Pineau[‡], Shuang Gu[§], Natalia Guschinskaya[‡], Richard W. Pickersgill^{§1}, and Vladimir E. Shevchik^{‡2}

From the [‡]Université de Lyon, F-69003, Université Lyon 1, INSA-Lyon, Villeurbanne F-69621, CNRS, UMR5240, Microbiologie Adaptation et Pathogénie, Lyon F-69622, France and the [§]School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary University of London, London E1 4NS, United Kingdom

Background: The type II secretion system is a multiprotein complex spanning both membranes of Gram-negative bacteria.

Results: We studied organization of the GspC and GspD subunits and map their interaction sites within the functional machinery.

Conclusion: GspC and GspD subunits are organized in a dynamic network, involving multiple transient interactions.

Significance: These findings are crucial to understand the mechanism of this secretion machinery.

The type II secretion system (T2SS) secretes enzymes and toxins across the outer membrane of Gram-negative bacteria. The precise assembly of T2SS, which consists of at least 12 core-components called Gsp, remains unclear. The outer membrane secretin, GspD, forms the channels, through which folded proteins are secreted, and interacts with the inner membrane component, GspC. The periplasmic regions of GspC and GspD consist of several structural domains, HR^{GspC} and PDZ^{GspC}, and N0^{GspD} to N3^{GspD}, respectively, and recent structural and functional studies have proposed several interaction sites between these domains. We used cysteine mutagenesis and disulfide bonding analysis to investigate the organization of GspC and GspD protomers and to map their interaction sites within the secretion machinery of the plant pathogen *Dickeya dadantii*. At least three distinct GspC-GspD interactions were detected, and they involve two sites in HR^{GspC}, two in N0^{GspD}, and one in N2^{GspD}. None of these interactions occurs through static interfaces because the same sites are also involved in self-interactions with equivalent neighboring domains. Disulfide self-bonding of critical interaction sites halts secretion, indicating the transient nature of these interactions. The secretion substrate diminishes certain interactions and provokes an important rearrangement of the HR^{GspC} structure. The T2SS components OutE/L/M affect various interaction sites differently, reinforcing some but diminishing the others, suggesting a possible switching mechanism of these interactions during secretion. Disulfide mapping shows that the organization of

GspD and GspC subunits within the T2SS could be compatible with a hexamer of dimers arrangement rather than an organization with 12-fold rotational symmetry.

The transport of proteins and nucleoprotein complexes across the two membranes of the Gram-negative bacteria requires specialized secretion machineries. The type II secretion system (T2SS)³ is widely employed by pathogenic Gram-negative bacteria to secrete toxins and lytic enzymes facilitating host invasion (1, 2). The plant pathogen *Dickeya dadantii* (ex *Erwinia chrysanthemi*) uses this system, called Out, to secrete several cell wall-degrading enzymes. Dependent on bacteria, the T2SS consists of 12–15 proteins, generally called GspA to GspO and GspS, and certain of them constitute large oligomeric assemblies. The T2SS spans the two bacterial membranes and ensures secretion of folded proteins across the outer membrane pore formed by GspD. GspC, GspL, GspM, and GspF constitute together the inner membrane complex (3–6). The cytoplasmic domains of GspL and GspF interact with an ATPase, GspE. GspE is thought to energize the formation of a short pseudopilus by several pilin-like proteins, GspG to GspK. This pseudopilus probably pushes the proteins through the outer membrane pore, constituted by GspD. The opening of this pore would need to be tightly regulated to allow for an efficient secretion of large folded proteins but, at the same time, prevent any leakage of the periplasmic constituents. GspD and GspC possess large periplasmic regions that are thought to interact and to be involved in the recognition of the secretion substrate (7–10).

The secretin GspD is the unique outer membrane core component of the T2SS (1, 11). In some T2SSs, an outer membrane lipoprotein, pilotin GspS, ensures proper targeting and assembly of the cognate secretin (12–14). Secretins are also involved

* This work was supported by the CNRS, a grant from French ANR-2010-BLANC-1531 SecPath program and LyonBioPole, the Biotechnology and Biological Sciences Research Council, Higher Education Funding Council for England, and Queen Mary University of London.

§ This article contains supplemental Tables S1 and S2, Figs. S1–S7, and text.

¹ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 44-0-20-7882-8444; Fax: 44-0-20-7882-7732; E-mail: r.w.pickersgill@qmul.ac.uk.

² To whom correspondence may be addressed: Université de Lyon, Bat. Lwoff, 10, rue R. Dubois, Villeurbanne, F-69622, France. Tel.: 33-0-4-72-44-58-27; Fax: 33-0-4-72-43-15-84; E-mail: vladimir.shevchik@insa-lyon.fr.

³ The abbreviations used are: T2SS, type II secretion system; ETEC, enterotoxigenic *Escherichia coli*; HR, homology region; PDB, Protein Data Bank; T4P, type IV pili.

TABLE 1
Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain	Genotype/phenotype	Reference
<i>Escherichia coli</i> NM522	<i>supE thi-1 Δ (lac-proAB)Δ (mcrB-hsdSM)5 (r_K⁻ m_K⁺)</i> [F' <i>proAB lacI^qΔM15</i>]	Stratagene
<i>Dickeya dadantii</i> A350	<i>rafR ganB</i>	(42)
A3556	<i>rafR ganB ΔoutC</i>	(9)
A3558	<i>rafR ganB ΔoutD</i>	(9)
A5274	<i>rafR ganB outC</i> (V143C)	This work
A5176	<i>rafR ganB outC</i> (V144C)	This work
A5177	<i>rafR ganB outC</i> (L145C)	This work
A5211	<i>rafR ganB outC</i> (V153C)	This work
A5212	<i>rafR ganB outC</i> (L154C)	This work
Plasmids		
pTdB-oC ^a	pT7-6 carrying <i>outC</i> under <i>PpelC</i>	(9)
pTdB-oD ^a	pT7-6 carrying <i>outD</i> under <i>PpelC</i>	(24)
pTdB-oCoD ^a	pT7-6 co-expressing <i>outC</i> and <i>outD</i> under <i>PpelC</i>	This work
pTDLB-oCoD ^a	pT7-6 carrying <i>pelB</i> followed by <i>outC</i> and <i>outD</i> under <i>PpelC</i>	This work
pACT3	Cloning vector, p15A <i>ori</i> , the <i>tac</i> promoter, Cm ^R	(43)
pACT3-oS	pACT3 carrying <i>outS</i> under <i>Ptac</i>	This work
pACYC184	Cloning vector, p15A <i>ori</i> , Tc ^R , Cm ^R	(44)
pACPLB	pACYC184 carrying <i>pelB</i>	(24)
pBADIK	Cloning vector, pBAD24 derivative, K _m ^R	(45)
pK-ELM	pBADIK co-expressing HA-OutE, VSV-OutL and cMyc-OutM	B. Py

^a Plasmids expressing cysteine variants of OutC and OutD are listed in supplemental Table S1.

in certain other transport machineries, namely the type III secretion system (T3SS), type IV pili (T4P) and the filamentous phage assembly (15–18). Secretins form pore-like toroidal structures composed of 12–14 protomers, through which secretion substrates can be translocated (16, 18–21). The pore-forming activity has been attributed to the conserved C-terminal portion of secretins, whereas their variable N-terminal part is thought to span the periplasm and to be involved in the recognition of the secretion substrate (9, 22–25). In the secretin GspD, this region consists of four domains, N0–N3. The recently elucidated crystal structure of the N0–N1–N2 domains from ETEC revealed their structural homology with several domains from certain other bacterial and phage machineries (26–28). Specifically, the N0 domain is found in secretins from T2SS, T3SS, and T4P and is structurally similar to certain domains from T4SS, T6SS, and from a TonB-dependent receptor FpvA (18). The N1 and N2 domains both exhibit a similar KH-like fold and show a significant structural homology with several ring-forming proteins from T3SS. The four periplasmic domains of GspD together form a vestibule-like structure, in which the secretion substrate could be loaded prior to being secreted (20, 25).

GspC is an inner membrane protein consisting of a short N-terminal cytoplasmic sequence and an α -helical transmembrane segment, followed by two periplasmic domains: a so-called homology region (HR) and a C-terminal PDZ domain (29, 30). The transmembrane segment of OutC drives the protein oligomerization (31). The PDZ domain seems to be involved in the recognition of certain secretion substrates (9), but it may be substituted by a coiled-coil domain or it may even be absent in some GspCs (30). The structural analysis supposed that the PDZ domain of GspC could exhibit a particular mode of substrate recognition (7). The structure of the HR domain from *Escherichia coli* and *D. dadantii* has recently been elucidated and revealed a β -sandwich fold consisting of two β -sheets each composed of three anti-parallel β -strands (32,

33). HR was shown to interact with the periplasmic region of GspD (7, 8), but the molecular mechanisms of this interaction remain elusive. Truncation analysis, combined with pulldown assays, revealed that a short segment of HR, consisting of strands $\beta 6^{\text{HR}}$ and $\beta 7^{\text{HR}}$, interacts with two distinct sites of GspD, one located in the N0 domain and another in the N2–N3 domains (8). Recent structural studies have addressed this question by crystallographic and NMR analysis, and they indicate another mode of interaction. Both the crystal and the solution HR/N0 interfaces involve strand $\beta 1^{\text{HR}}$ of HR but with two different sites in N0, strands $\beta 1^{\text{N0}}$ and $\beta 3^{\text{N0}}$, respectively (32, 33).

In this study, we have exploited these recent structural data and used cysteine mutagenesis and *in vivo* disulfide bonding analysis to map the interactions between the HR domain of OutC (GspC) and the periplasmic region of OutD (GspD) in their native environment, namely the T2SS of the plant pathogen *D. dadantii*. We have found at least three relevant sites of interaction, we have demonstrated that some other T2SS components and the secreted proteins affect these interactions, and we have revealed some important features of organization of the GspD and GspC protomers within the secretion machinery.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains, Plasmids, and Growth Conditions—The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1 and supplemental Table S1. The bacteria were usually grown in Luria-Bertani (LB) medium at 30 °C with shaking at 150 rpm. When required, antibiotics were used at the following final concentrations: 50 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol, 150 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin.

DNA cloning and manipulation were carried out using standard methods. Site-directed mutagenesis was performed with the QuikChange kit (Stratagene) and the primers listed in supplemental Table S2. The sequences of mutant genes were all checked (Eurofins MWG Operon). Plasmids pTdB-oC and

GspC-GspD Disulfide Bonding Analysis

pTdB-oD, expressing *outC* or *outD* genes, respectively, under the control of *PpelC*, were constructed earlier (9, 24). The pTdB-oCoD plasmid, co-expressing *outC* and *outD* genes, was constructed by cloning the corresponding DNA fragment under the control of *PpelC*. To co-express the pectate lyase PelB with *outC* and *outD*, *pelB* was cloned upstream of *PpelC*, thus creating pTDLB-oCoD.

D. dadantii mutant strains, carrying chromosomal mutant *outC* alleles that code for cysteine variants, were constructed by marker exchange-avoidance mutagenesis, as described previously (9). Briefly, the *D. dadantii* A2365 strain, sucrose-sensitive and secretion-deficient because it carries the *nptI-sacB-sacR* (Km^R) cartridge into the chromosomal *outC*, was transformed with a pTdB-oC plasmid bearing the required mutant *outC* gene. Then, the mutant allele was exchanged for the chromosomal allele by selecting for sucrose tolerance and sensitivity to kanamycin. A correct recombination of the *outC* mutant alleles into the chromosome was systematically checked by PCR using OuC and ROuC primers (supplemental Table S2).

Functional Tests and in Vivo Disulfide Cross-linking Analysis—To assess the functional relevance of single cysteine substitutions in OutC and OutD, each mutant allele was introduced into either a pTdB-oC or a pTdB-oD plasmid and expressed in *D. dadantii* $\Delta outC$ or $\Delta outD$ mutant strain, respectively. The level of pectinase secretion, which reflects the functionality of the respective variants, was assessed by immunoblotting with anti-PelD and anti-PelI antibodies, as described (31).

To assess the extent of disulfide cross-linking, the spontaneous formation of disulfide bonds in steady-state cultures was examined. We considered that the oxidative environment of the periplasm is adequate for generating disulfide bonds between proximal residues during bacterial growth. Preliminary experiments showed that induction of disulfide bonding by the addition of an external oxidant, copper phenanthroline, increased the extent of cross-linking but drastically reduced its specificity (data not shown). Briefly, bacteria were grown overnight at 30 °C in LB supplemented, if necessary, with 1 mM isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside, 0.3 mg/ml arabinose, and appropriate antibiotics. Cells from 1 ml of culture (A_{600} of 2.0) were spun at $10,000 \times g$ for 1 min and washed with TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl). Next, to block the free thiol groups and prevent further disulfide bond formation, the cells were incubated in the same volume of 20 mM iodoacetamide in TBS for an additional 30 min at 25 °C. The cells were then pelleted, resuspended in 200 μ l of Laemmli sample buffer, without 2-mercaptoethanol, and lysed in boiling water for 10 min. The samples were subsequently incubated for 15 min at 30 °C with benzonase (Sigma-Aldrich), separated using 10% SDS-PAGE, and then analyzed by immunoblotting with anti-OutC and anti-OutD antibodies, as described previously (9, 24).

Molecular Modeling—The N-terminal part of OutD (residues 28–262) was modeled with the homology molecular modeling program MODELLER 9v10 (34). The software identified the following two crystal structures as templates, allowing a confident modeling of the studied region: PDB ID 3EZJ (N-terminal domain of the secretin GspD from *E. coli* ETEC H10407) and PDB ID 3OSS (GspC-GspD complex from the type II secre-

tion system of *E. coli* ETEC H10407). Twenty distinct models have been generated, and their geometry was assessed by a Ramachandran plot calculated with the program PROCHECK (35). The most satisfying model was then retained. It has 92.4% of nonproline and nonglycine residues in the most favored regions, 7.6% in additionally allowed regions, and none in disallowed regions.

RESULTS

Experimental Strategy of Cysteine Scanning Mutagenesis of OutC and OutD—OutD and the periplasmic region of OutC are naturally lacking cysteines. The only endogenous Cys-27 is located in the transmembrane segment of OutC and does not form disulfide bonds *in vivo* (31). Therefore, we first introduced single cysteine substitutions into several selected sites of OutC and OutD and assessed the functionality and disulfide cross-linking pattern of each of these single variants in *D. dadantii* $\Delta outC$ and $\Delta outD$ strains, respectively. Then, combinations of OutC and OutD variants were co-expressed, and the extent of disulfide cross-linking between them was systematically assessed to estimate the proximity of the corresponding sites. Based on previous studies, we restricted this analysis to certain positions selected in the HR domain of OutC and the N0, N2, and N3 domains of OutD. Notably, recent structural studies have indicated that the HR/N0 interface involves strand $\beta 1^{\text{HR}}$ and could include either strand $\beta 1^{\text{N0}}$ or $\beta 3^{\text{N0}}$ (32, 33). Thus, some residues involved in these putative interfaces were examined, namely Gly-99 and Val-100 ($\beta 1^{\text{HR}}$), Ser-33 and Phe-34 ($\beta 1^{\text{N0}}$), and Ile-64 and Ser-65 ($\beta 3^{\text{N0}}$) (Fig. 1). In a previous *in vitro* study (8), the OutC-OutD interaction sites had been mapped to a short segment of the HR domain, consisting of strands $\beta 6^{\text{HR}}$ and $\beta 7^{\text{HR}}$, and to two distant, but less definite sites of OutD, involving the N0 and N2-N3 domains, respectively (8). To examine this site of HR, cysteines were introduced into the $\beta 6^{\text{HR}}$ and $\beta 7^{\text{HR}}$ strands to replace Val-143, Val-144, Leu-145, Tyr-151, Val-153, and Leu-154 (Fig. 1). Because the HR domain and the presumed structural HR/N0 interfaces are composed exclusively of β -strands, a plausible mode of HR-OutD interactions could be the “ β -strand addition” mechanism (36). The N0, N1, and N2 domains have mixed α/β -folds, and several β -strands could be potentially involved in such interactions. Consequently, in addition to the OutD variants mentioned above, several residues located in strands $\beta 2^{\text{N0}}$ (Thr-53, Val-54, Ile-55, and Ile-56), $\beta 10^{\text{N2}}$ (Val-232), $\beta 11^{\text{N2}}$ (Val-241) and in the presumed strand $\beta 12^{\text{N3}}$ (Val-271 and Ile-272) were selected for this study (Fig. 1). Strand $\beta 2^{\text{N0}}$ was investigated in particular because it was thought to bind an extra β -strand from another protein (26).

Periplasmic Domains of OutD Form Homodimers—To examine the relevance of the selected cysteine substitutions in OutD, the corresponding variants were expressed in the *D. dadantii* $\Delta outD$ A3558 strain. Although all of these OutD variants were produced at the wild-type level (Fig. 2B, lower), some of them were fully or partially defective in secretion. More precisely, secretion was fully arrested with F34C, T53C, I55C, I64C, and V232C variants and partially impaired with S33C, S65C, V241C, and G190C, but it was at the wild-type level with the other cysteine variants (Fig. 2A). Nonreducing gels revealed a

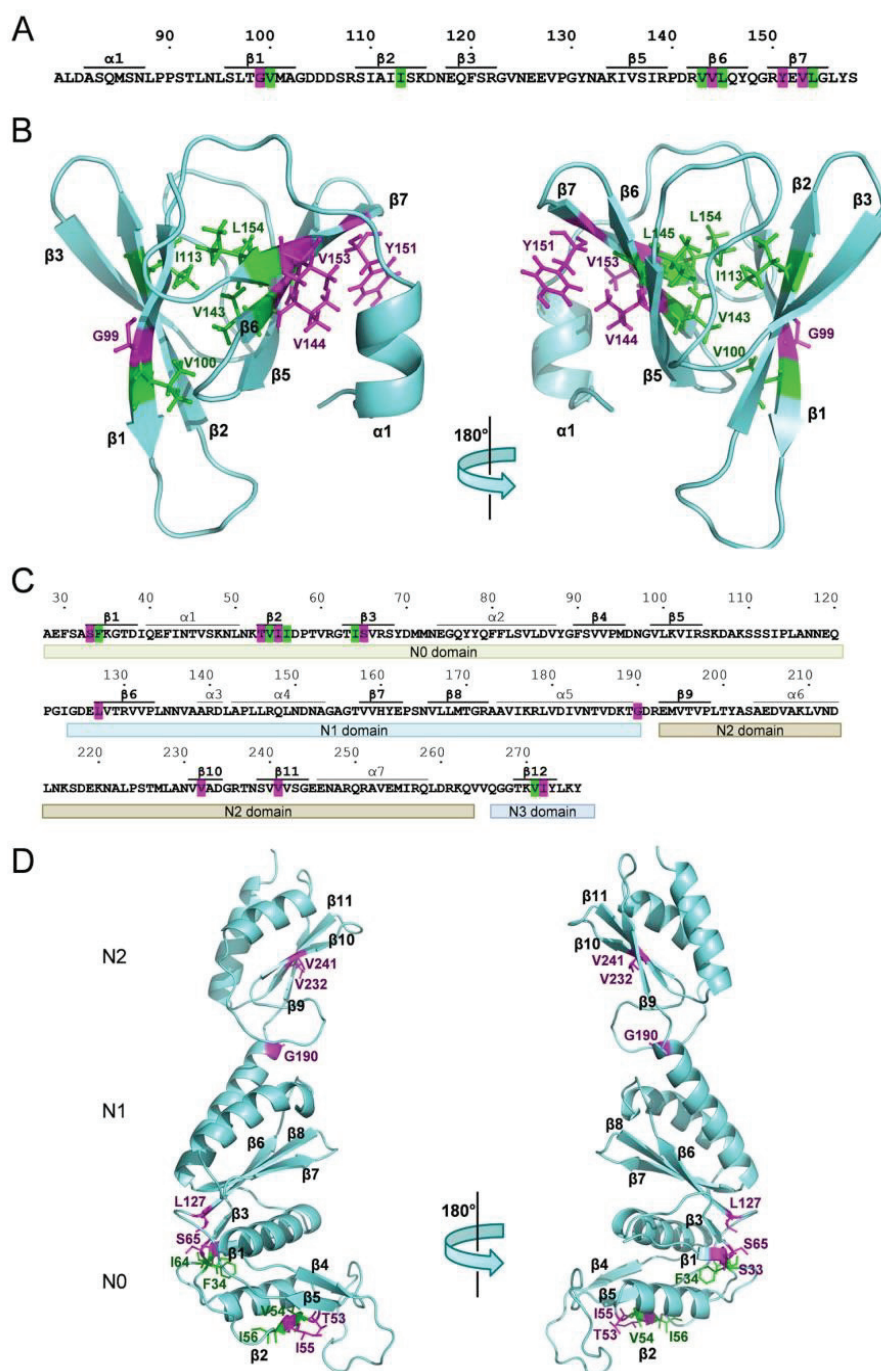


FIGURE 1. Overview of the positions in OutC and OutD selected for cysteine mutagenesis. A and C, sequence of the HR domain of OutC (A) and of N0-N1-N2 domains of OutD (C) from *D. dadantii*, with positions of secondary structure elements. The positions of the cysteine substitutions analyzed in this study are highlighted. B and D, structure of the HR domain of OutC (B) and of the N0-N1-N2 domains of OutD (D). The residues supplemented with cysteine are represented as sticks. B and D were produced using PyMOL. The HR structure is from Ref. 33 (PDB 2LNV), and the N-terminal part of OutD (residues 28–262) was modeled with the homology molecular modeling program MODELLER 9v10 (34) by using the structure of peri-GspD from ETEC as template (PDB ID 3EZJ and 3OSS) (26, 32). The solvent-exposed side chains are shown in magenta, and the buried ones are in green. To visualize the substituted residues more clearly, the structures were rotated around the y axis by 180°.

variable quantity of homodimers with the tested OutD variants, except for L127C, V271C, and I272C which remained monomeric (Fig. 2B). Consistent with the structural data, cysteine substitutions of residues with solvent-exposed side chains, e.g. Thr-53 and Ile-55 (strand $\beta 2^{N0}$), generated a far greater quan-

tity of dimers than those of the adjacent, but buried, residues Val-54 and Ile-56 (Fig. 2B, compare lanes 5 and 7 with 6). Consistent with the contrasting cross-linking patterns, the latter two OutD variants were functional whereas T53C and I55C were completely defective in secretion (Fig. 2A, lanes 7–10).

GspC-GspD Disulfide Bonding Analysis

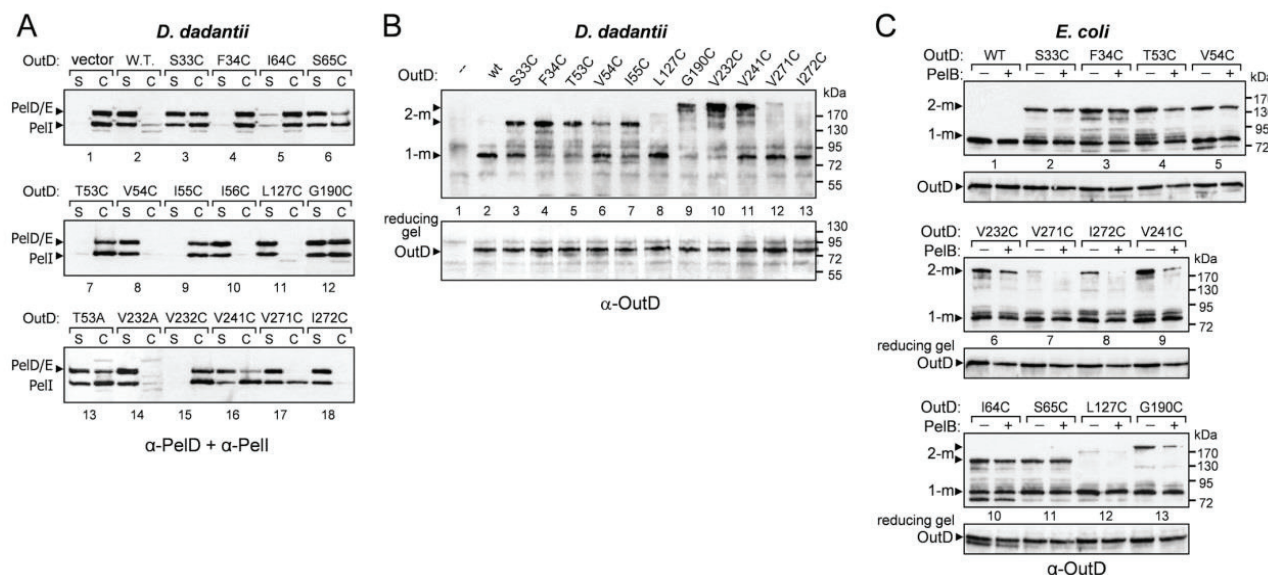


FIGURE 2. Functionality and disulfide bonding patterns of cysteine variants of OutD. A, secretion activity of OutD variants. *D. dadantii* A3558 Δ outD cells, carrying a pTdB-oD plasmid with a mutant *outD* allele (indicated on top), were grown aerobically to steady state, and then the culture supernatant (s) and cells (c) were separated and analyzed by immunoblotting with PelD and PelI antibodies. The quantity of secreted proteins present in the culture supernatant reflects the efficiency of secretion. B, disulfide bonding analysis of OutD variants. Cells from the same cultures as in A were treated with iodoacetamide, to block any remaining free thiol groups, and the extent of disulfide bonding was assessed using nonreducing SDS-PAGE, followed by immunoblotting with OutD antibodies. To estimate the amounts of OutD loaded onto the gels, the same samples were analyzed in reducing conditions with 2-mercaptoethanol (lower). C, secreted protein PelB effect on self-bonding of OutD variants: disulfide bonding analysis of the periplasmic domains of OutD. *E. coli* NM522/pACoS (*outs*+) cells, carrying a pTdB-oD plasmid with a mutant allele of *outD* and either an empty pACYC184 vector (–) or pACPLB (*pelB*) (+) were grown, treated, and analyzed with OutD antibodies as in B. An equivalent amount of cells was loaded into each well. The positions of OutD monomers (1-m) and dimers (2-m) are indicated by arrowheads. The relative amount of homodimer formed by each variant reflects the proximity of the respective residue to the same residue of a neighboring OutD protomer. Note that the homodimers formed by cysteine substitutions close to the protein terminus migrate faster than those located in the middle portion of the protein. Such an altered mobility could result from a different overall shape of these dimers, V-like for the first and X-like for the latter.

Notably, the two other nonfunctional variants, F34C and V232C, also efficiently generated homodimers (Fig. 2B, lanes 4 and 10). Supporting the view that the loss of function is due to cross-linking of neighboring domains as opposed to a problem of protein folding, alanine substitutions of Thr-53 and Val-232 were functional (Fig. 2A, lanes 13 and 14). A prominent self-cross-linking of certain OutD variants indicates that the corresponding residues are close to the equivalent residues of the neighboring OutD subunit. An explanation for this could be that neighboring N0 domains interact via two distinct sites involving, on the one hand, the β 1^{N0} strand (F34C) and, on the other hand, the β 2^{N0} strand (T53C and I55C) (Fig. 1, C and D, and supplemental Fig. S1).

When the OutD variants were co-expressed with the pilotin OutS, in *E. coli* cells lacking a T2SS, the respective cross-linking patterns were roughly similar to those in *D. dadantii* (Fig. 2C). However, the difference between the solvent-exposed and buried residues was slightly less obvious (compare the extent of dimerization of T53C and V54C in Fig. 2, B and C). This suggests that in the absence of the functional T2SS, the interdomain contacts of OutD subunits are more flexible and disordered. The recent model suggests that the GspD periplasmic domains form a vestibule where the secretion substrate could be loaded (20, 25). We, therefore, investigated whether the secreted protein PelB affects the extent of self-bonding of OutD. In the presence of PelB, most analyzed variants, except for S33C, F34C, I64C, and S65C, generated a smaller amount of homodimer (Fig. 2C). These data suggest that the secreted pro-

tein weakens the mutual proximity of certain sites, implying rearrangements of the periplasmic domains of OutD within the dodecameric complex.

Disulfide Bonding Analysis of HR Domain of OutC—To evaluate the relevance of cysteine substitutions in the HR domain of OutC, corresponding mutant alleles were first expressed from a plasmid in the *D. dadantii* Δ outC A3556 strain. The abundance of all of the mutants was equivalent to that of the wild-type OutC (Fig. 3B, lower) and functionality was only lost in G99C (β 1^{HR}) (Fig. 3A, lane 9). This variant generated a huge amount of homodimer, which appeared in form of three major species (Fig. 3B, lane 9). Consistent with the HR structure, cysteine substitutions of the adjacent, but buried, residues Val-100 and Ile-113 produced only a small quantity of homodimer (Figs. 3B and 4B, lane 3). In contrast, cross-linking of the substitutions located in the second β -sheet (strands β 6^{HR} and β 7^{HR}) was inconsistent with the published HR structure. A significant amount of homodimer was generated by the buried L145C and L154C but not the solvent-exposed V144C and V153C (Fig. 3B, lanes 5–8). An efficient dimerization of L145C and L154C correlates with a reduced functionality of these variants (Fig. 3A, lanes 6 and 8). These data suggest that neighboring HR domains can interact through two opposite sites, one including the solvent-exposed face of the first β -sheet (G99C, β 1^{HR}) and the other involving the side chains of Leu-145 and Leu-154 (β 6^{HR} and β 7^{HR}, respectively) (supplemental Fig. S2).

It cannot be excluded that unexpected disulfide bonding patterns of the latter OutC variants could be caused by their

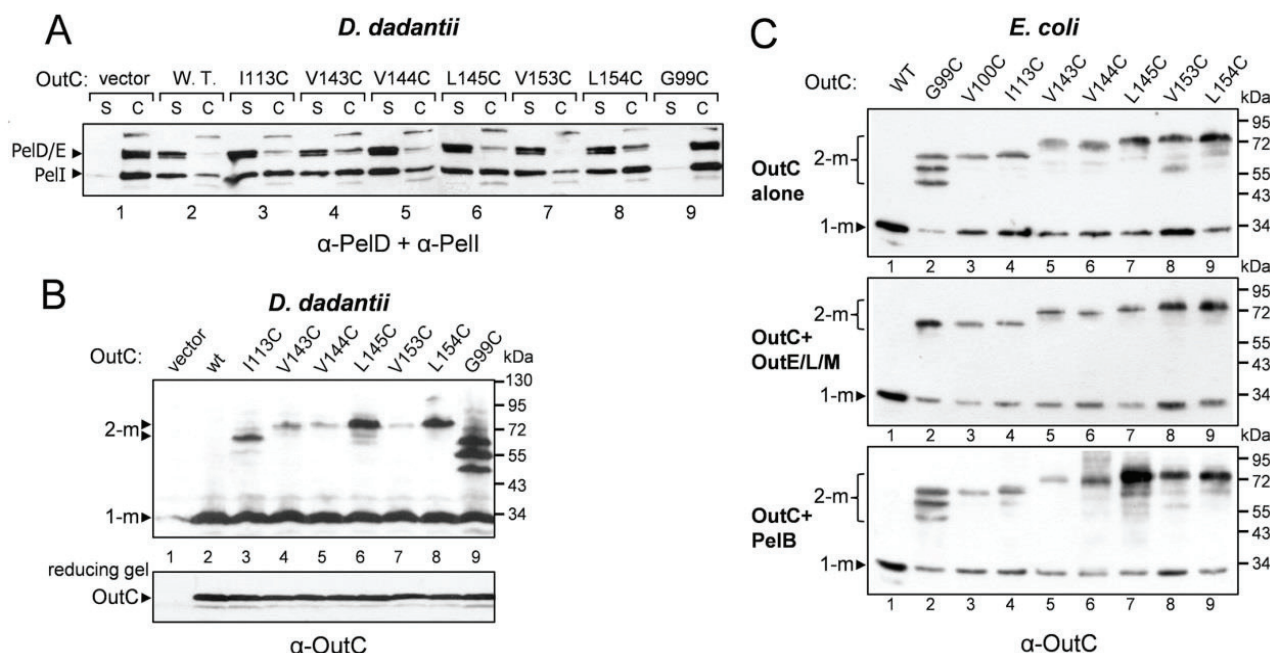


FIGURE 3. Functionality and disulfide bonding patterns of cysteine variants of OutC. A, secretion activity of OutC variants. B, disulfide bonding analysis of OutC variants. *D. dadantii* A3556 Δ outC cells, carrying a pTdB-oC plasmid with a mutant outC allele (indicated on top) were grown, treated, and analyzed with either PelD and PelI antibodies (A) or with OutC antibodies (B), as in Fig. 2. The positions of OutC monomers (1-m) and dimers (2-m) are indicated by arrowheads. C, secreted protein PelB and the T2SS components OutE/L/M effect on self-bonding of OutC variants. *E. coli* NM522 cells, carrying a pTdB-oC plasmid with a mutant allele of outC and either an empty pACYC184 vector (top) or pBAD-ELM (outE/L/M; middle), or pACPLB (pelB; bottom), were grown and treated as in Fig. 2B but with OutC antibodies. The three panels were exposed for different times to ensure an equivalent intensity of the wild-type OutC (lane 1). The positions of monomers and dimers are indicated by arrowheads and/or brackets.

expression from plasmids. In this way, mutant outC genes, coding for certain cysteine variants, were recombined into the *D. dadantii* chromosome in place of the wild-type allele. The secretion efficiency and disulfide bonding patterns of these mutant strains were similar to those of the corresponding variants expressed from a plasmid (supplemental Fig. S3). Notably, homodimers of OutC were only detected in A5177 and A5212 strains expressing L145C and L154C variants, respectively (supplemental Fig. S3B), that supports functional relevance of these self-bondings.

The inner membrane T2SS components, OutL and OutM, and the secretion substrates are thought to interact with OutC (5, 9, 37, 38). To test whether these proteins could influence the arrangement of adjacent HR domains, selected OutC variants were expressed in *E. coli* cells. In comparison with that in *D. dadantii*, a greater quantity of dimers were detected (compare the dimer/monomer ratio in Fig. 3, B and C) that suggests more disordered interdomain contacts. Nevertheless, the dimer ratio remained most significant with G99C, L145C, and L154C variants (Fig. 3C, top, lanes 2, 7, and 9). The co-expression of OutE, OutL, and OutM did not significantly affect the cross-linking patterns, except G99C produced a single cross-linking product (Fig. 3C, middle, lane 2). This suggests that OutE/L/M significantly affect the $\beta 1^{\text{HR}}-\beta 1^{\text{HR}}$ contact. In contrast, the co-expression of PelB mostly affects the second β -sheet; namely, L145C variant became more abundant and generated a far greater quantity of dimer (Fig. 3C, bottom, lane 7). Thus, the secreted protein reinforces the $\beta 6^{\text{HR}}-\beta 6^{\text{HR}}$ contact.

Interface between HR Domain of OutC and N0 domain of OutD Seen in Crystal Structure Is Biologically Relevant—The recent structural studies suppose that the HR/N0 interface involves strand $\beta 1^{\text{HR}}$ and may include two different, but adjacent, sites in N0, namely strand $\beta 1^{\text{N0}}$ or $\beta 3^{\text{N0}}$ (32, 33). To assess the biological relevance of the presumed crystal interface, which includes the $\beta 1^{\text{HR}}-\beta 1^{\text{N0}}$ contact, the cysteine substitutions in HR (G99C and V100C) were combined pairwise with those in N0 (S33C and F34C), and, subsequently, the cross-linking patterns of respective OutC-OutD pairs were analyzed in *E. coli* and *D. dadantii* Δ outC and Δ outD strains. A quantity of the OutC-OutD complex was detected with the OutC^{G99C}-OutD^{F34C} pair but not with the other three combinations (Fig. 4, A and B, compare lane 6 with 2–5 and 7). These results are consistent with the orientations of the corresponding side chains in the crystal HR/N0 interface and indicate its biological relevance. In contrast, the OutC^{G99C}-OutD^{S65C} couple, which would link the modeled solution structure HR/N0 interface ($\beta 1^{\text{N0}}-\beta 3^{\text{N0}}$), generated only low amounts of OutC-OutD complex (Fig. 4, A and B, compare lanes 9 and 10 with 6), suggesting that this interface may not be biologically relevant. However, in all cases, homodimers of the respective OutC and OutD variants were the main cross-linking products (Fig. 4, B and D), indicating that self-interactions of the HR and N0 domains were much more prevalent than any interaction between these two domains. The functional impact of the OutC^{G99C}-OutD^{F34C} complex remains unclear. Because both OutC^{G99C} and OutD^{F34C} single substitutions were defective in secretion

GspC-GspD Disulfide Bonding Analysis

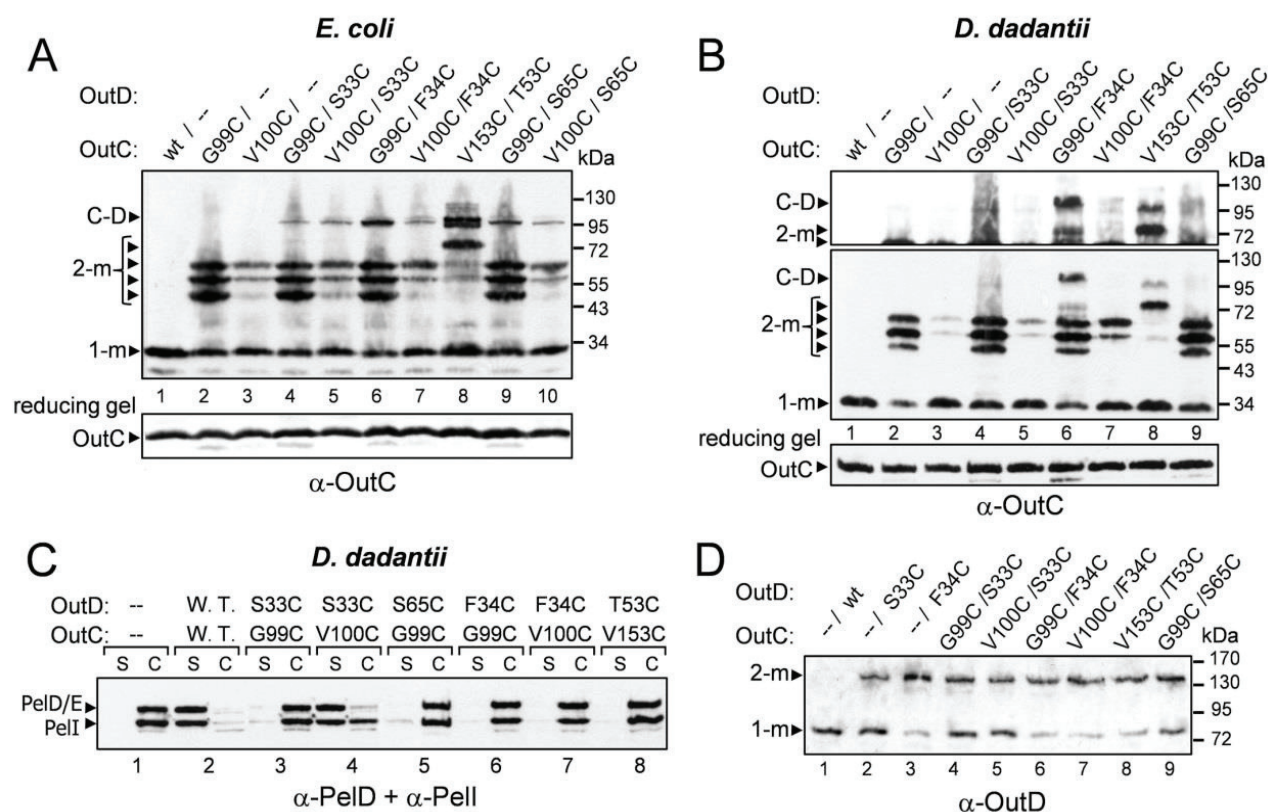


FIGURE 4. Disulfide bonding and functional analysis of the HR-N0 interaction sites deduced from structural studies. *E. coli* NM522/pAcCoS (*outs*⁺) (A) or *D. dadantii* A3556 Δ outC (B and C) or *D. dadantii* A3558 Δ outD (D) cells, carrying a pTdB-oCoD plasmid co-expressing mutant alleles of *outC* and *outD* (indicated on top), were grown, treated, and analyzed, as in Fig. 2. The quantity of each OutC variant was estimated from the reducing gel (lower panels). The positions of monomers (1-m), dimers (2-m), and OutC-OutD complexes are indicated by arrowheads. In B, the upper panel was overexposed, compared with the middle panel, to reveal the high molecular mass forms more clearly. Among the combinations of G99C and V100C variants of OutC with S33C, F34C, and S65C variants of OutD, only G99C/F34C provokes an efficient OutC-OutD bonding, both in *E. coli* and *D. dadantii* (A and B, lane 6). A comparable degree of OutC-OutD bonding in the G99C/F34C and V153C/T53C pairs suggests an equivalent biological relevance of the corresponding interactions.

(Figs. 2A and 3A) the OutC-OutD combinations, including one of these variants, were also nonfunctional (Fig. 4C).

Mapping of Two Other OutC-OutD Interaction Sites—Next, the relevance of the OutC-OutD interactions suggested by the previous *in vitro* study (8) was examined. These two presumed interfaces include a short segment of the HR domain, consisting of strands β_6^{HR} and β_7^{HR} , and two distinct sites of OutD, located in the N0 and N2-N3 domains, respectively. Therefore, the cysteine substitutions of Val-143, Val-144 (β_6^{HR}), Val-153, and Leu-154 (β_7^{HR}) in HR were combined pairwise with those in OutD, Thr-53, Val-54, Ile-55, Ile-56 (β_2^{N0}), Val-232 (β_{10}^{N2}), Val-241 (β_{11}^{N2}), Val-271, and Ile-272 (β_{12}^{N3}), and then co-expressed in *E. coli*. A quantity of OutC-OutD complex was detected with the OutC^{V153C}-OutD^{T53C} and OutC^{V153C}-OutD^{V232C} pairs, both including the same variant, OutC^{V153C}-OutD^{V232C} (β_7^{HR}) (Fig. 5, lanes 5 and 13). The nature of these complexes was confirmed by immunoblotting with both OutC and OutD antibodies (supplemental Fig. S4). In contrast, OutC^{V153C} (β_7^{HR}) did not form a complex with V241C (β_{11}^{N2}) or V271C (β_{12}^{N3}), indicating that strand β_7^{HR} is proximal to strand β_{10}^{N2} but not to β_{11}^{N2} or β_{12}^{N3} (supplemental Figs. S4 and S5). Conversely, no complex was detected when V144C (β_6^{HR}) was used instead of V153C (β_7^{HR}), indicating that contrary to strand β_7^{HR} , β_6^{HR} is not close to strand β_2^{N0} (T53C) or to

β_{10}^{N2} (V232C) (Fig. 5, lanes 1 and 9). Consistent with the HR structure, the extent of cross-linking decreased when the buried L154C was used instead of the solvent-exposed V153C (Fig. 6A, lanes 3 and 4). Similarly, consistent with the N0 structure, cysteine substitutions of Thr-53 and Ile-55 (solvent-exposed) but not of Val-54 (buried) gave prominent cross-links with OutC^{V153C} (Fig. 6A, lanes 1–3). To further characterize the mutual orientation of the β_7^{HR} and β_2^{N0} strands, the proximity of Y151C and V153C (β_7^{HR}) to T53C and I55C (β_2^{N0}) was estimated. The cross-linking patterns suggest that Y151C is closer to T53 than to I55 whereas V153 has a similar proximity to T53 and I55 (Fig. 6A). This is consistent with a parallel arrangement of the two β -strands (Fig. 6B).

Thus, these data suggest the presence of at least three interactions between the HR domain of OutC and the periplasmic domains of OutD, namely (i) OutC^{G99C}-OutD^{F34C} (β_1^{HR} - β_{10}^{N2}), (ii) OutC^{V153C}-OutD^{T53C} (β_7^{HR} - β_2^{N0}), and (iii) OutC^{V153C}-OutD^{V232C} (β_7^{HR} - β_{10}^{N2}). More unexpectedly, these results indicate that the same faces of the β_2^{N0} and β_{10}^{N2} strands (Thr-53 and Val-232) could control the self-interaction of OutD subunits and their interactions with HR.

Secreted Proteins and Inner Membrane Components of T2SS Have Different Effects on OutC-OutD Interacting Sites—To investigate whether the secreted proteins could influence

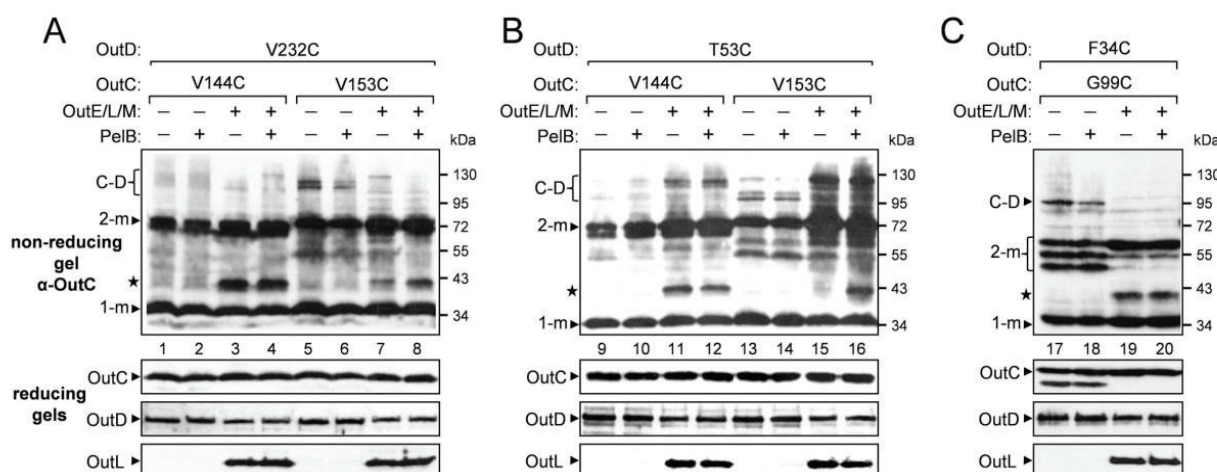


FIGURE 5. Secreted protein PelB and the T2SS components OutE/L/M affect disulfide bonding efficiency between various OutC and OutD variants differently. *E. coli* NM522/pACoS (*outs*⁺) cells carrying either a pTdB-oCoD (*pelB*[−]) or a pTPLB-oCoD (*pelB*⁺) plasmid, co-expressing the mutant alleles of *outC* and *outD* (indicated on top) and either an empty pBAD18 vector or pBAD-ELM (*outE/L/M*⁺), were grown, treated, and analyzed with OutC antibodies, as in Fig. 2B (upper panels). All samples were equilibrated to load an equivalent amount of each OutC variant, as estimated from gels in reducing conditions (lower panels). The monomers (1-m) and dimers (2-m) of OutC are indicated by arrowheads, and OutC-OutD complexes are indicated by brackets. An uncharacterized OutC adduct is indicated by an asterisk. The extent of disulfide bonding between OutC and OutD (upper panels) suggests that the same position of OutC (V153C, $\beta 7^{\text{HR}}$) is close to two distant positions of OutD, V232C ($\beta 10^{\text{N0}}$) (A) and T53C ($\beta 2^{\text{N0}}$) (B). When OutE/L/M are also co-expressed, the amount of the OutC-OutD complex in A and C decreased but increased in B. Co-expression of OutE/L/M provokes a more efficient homodimerization of both OutC variants (2-m), together with the appearance of an uncharacterized OutC adduct (indicated by an asterisk).

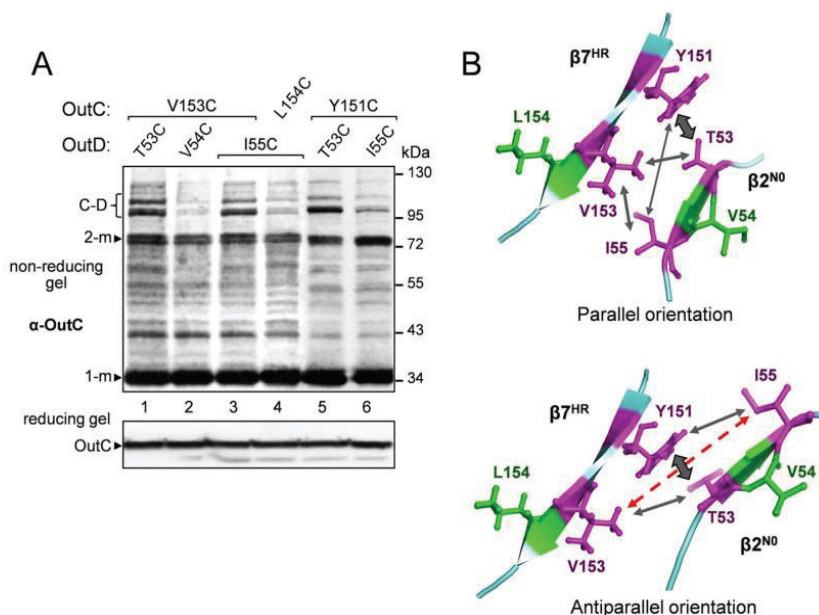


FIGURE 6. Analysis of the relative orientation of strands $\beta 7$ of HR and $\beta 2$ of N0 using disulfide bonding. A, *E. coli* NM522 cells carrying pACoS (*outs*⁺) and pTdB-oCoD plasmids, co-expressing mutant alleles of *outC* and *outD* (indicated on top), were grown, treated, and analyzed with OutC antibodies, as in Fig. 2B. All samples were equilibrated to load an equivalent amount of each OutC variant, as estimated from gels in reducing conditions (lower panels). The positions of OutC monomers (1-m), dimers (2-m), and OutC-OutD complexes are indicated by arrowheads and brackets, respectively. The extent of disulfide bonding suggests that Tyr-151 is closer to Thr-53 than to Ile-55, whereas Val-153 has the same proximity to both Thr-53 and Ile-55. B, two presumed modes of relative orientation of the $\beta 7^{\text{HR}}$ and $\beta 2^{\text{N0}}$ strands are shown. The solvent-exposed side chains are shown in magenta, and the buried ones are in green. Width of arrows reflects the proximity between the various residues. The parallel arrangement of these β -strands is compatible with the extent of disulfide bonding in A.

the OutC-OutD interactions, combinations of OutC-OutD variants were systematically co-expressed, either alone or together with the pectate lyase PelB, in *E. coli*. In the presence of PelB, the extent of cross-linking with the OutC^{G99C}-OutD^{F34C} and OutC^{V153C}-OutD^{V232C} pairs, representative of the first ($\beta 1^{\text{HR}}$ - $\beta 1^{\text{N0}}$) and the third ($\beta 7^{\text{HR}}$ - $\beta 10^{\text{N2}}$) inter-

acting sites, respectively, diminished (Fig. 5, A and C, lanes 5, 6, 17, and 18). In contrast, PelB did not have any obvious effect on the OutC^{V153C}-OutD^{T53C} couple, representative of the second interacting site ($\beta 7^{\text{HR}}$ - $\beta 2^{\text{N0}}$) (Fig. 5B, lanes 13 and 14). Thus, it seems likely that the secreted substrate has a different effect on the interactions of strand $\beta 7^{\text{HR}}$ with

GspC-GspD Disulfide Bonding Analysis

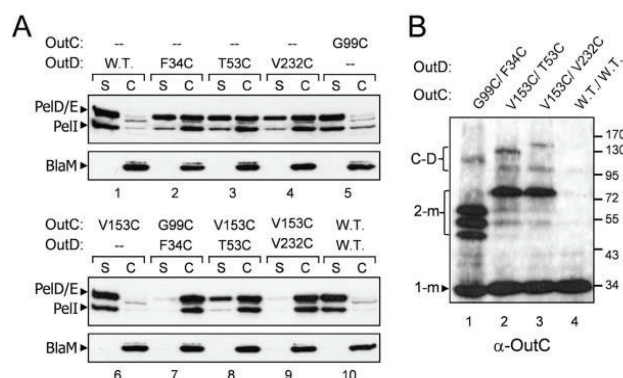


FIGURE 7. Cysteine variants of OutC and OutD interfere differently with pectinase secretion. *D. dadantii* wild-type strain was transformed with a plasmid expressing various alleles of *outC* and *outD* (indicated on top). The bacteria were grown, treated, and analyzed with either PelD and PelI antibodies (A) or with OutC antibodies (B), as in Fig. 2. The amount of secreted proteins (PelD, PelE, and PelI) in the culture supernatant reflects the efficiency of secretion. A, positions of OutC monomers (1-m), dimers (2-m), and OutC-OutD complexes are indicated by arrowheads and brackets.

strands $\beta 10^{N2}$ and $\beta 2^{N0}$ (Fig. 5, compare lanes 5 and 6 with 13 and 14).

Co-expression of OutE, OutL, and OutM with OutC-OutD pairs, in *E. coli* cells, provoked a significant increase in the quantity of OutC but not of OutD, and so the ratio of OutC increased in the presence of OutE/L/M. (supplemental Fig. S5). Because to assess the cross-linking between OutC and OutD, an equivalent amount of OutC was systematically loaded onto the nonreducing gels, the samples with OutE/L/M contained a slightly smaller amount of OutD (Fig. 5, reducing gel panels). Despite this, in the presence of OutE/L/M, the extent of cross-linking with the OutC^{V153C}-OutD^{T53C} pair ($\beta 7^{HR}$ - $\beta 2^{N0}$ site) was obviously increased (Fig. 5B, compare lanes 13 and 15). Remarkably, the largest cross-linked species (apparent mass of 120 kDa) became very abundant, suggesting that OutE/L/M enhanced this OutC-OutD interaction and/or improved stability of the complex. In contrast, OutE/L/M generated an opposite effect on the other two OutC-OutD interacting sites and the level of cross-linking with OutC^{V153C}-OutD^{V232C} ($\beta 7^{HR}$ - $\beta 10^{N2}$) and OutC^{G99C}-OutD^{F34C} ($\beta 1^{HR}$ - $\beta 1^{N0}$) decreased significantly (Fig. 5, A and C compare lanes 5 with 7 and 17 with 19). Thus, the secreted proteins and OutE/L/M components differently affect on the tested OutC-OutD interactions.

Various OutC and OutD Variants Interfere Differently with Functional T2SS of *D. dadantii*—Certain OutC (G99C) and OutD (F34C, T53C, and V232C) variants efficiently formed homo- and heterodimers and were fully nonfunctional when expressed in $\Delta outC$ or $\Delta outD$ *D. dadantii* strains (Figs. 2–4). At least in the case of T53C and V232C, dimerization likely is the direct cause of the loss of function (Fig. 2A). To estimate the interference of the cross-linked complexes with the functional T2SS, these variants were expressed in the wild-type *D. dadantii*. The three tested OutD variants significantly impaired secretion (Fig. 7A, lanes 2–4), indicating that they are integrated in the T2SS and compete efficiently with the wild-type OutD. In contrast, OutC^{G99C} did not produce any negative trans-dominant effect, suggesting that this variant does not compete with the wild-type OutC. Co-expression of the vari-

ants, representative of the three interaction sites, produced variable effects. Secretion was fully arrested with the OutC^{G99C}-OutD^{F34C} and OutC^{V153C}-OutD^{V232C} pairs but partially retained with OutC^{V153C}-OutD^{T53C} (Fig. 7A, lanes 7–9). Thus, it seems likely that the two former complexes, even if produced at a small quantity (Fig. 7B), interfere very efficiently with the functional T2SS and completely block it. In contrast, the OutC^{V153C}-OutD^{T53C} complex seems to be unable to interfere with the secretion system.

DISCUSSION

We have used cysteine scanning and disulfide bonding analysis to study the organization of OutC and OutD subunits in the T2S machinery and the interactions between these components. Although this analysis is not comprehensive, it does reveal some important features of the assembly of this secretion machinery. The disulfide bonding assays suggest the presence of at least three distinct sites of interactions between the periplasmic domains of OutC and OutD, namely 1) $\beta 1^{HR}$ - $\beta 1^{N0}$, 2) $\beta 7^{HR}$ - $\beta 2^{N0}$, and 3) $\beta 7^{HR}$ - $\beta 10^{N2}$ (supplemental Fig. S6). Interfaces 2 and 3 were already suggested in our previous study (8), and the first is consistent with the recently established crystal structure of the HR/N0-N1 complex (32). In contrast, disulfide bonding analysis suggested that the HR/N0 interface, detected in our recent NMR study ($\beta 1^{HR}$ - $\beta 3^{N0}$), is much less prevalent *in vivo* (33). However, it is also possible that an optimal arrangement of the cysteine substitutions has not been achieved in the latter case. Moreover, it should be noted that in the corresponding crystal and solution structures, the HR/N0 interface involves the same $\beta 1^{HR}$ -strand of HR but two different, though adjacent, β -strands of N0, $\beta 1^{N0}$, and $\beta 3^{N0}$, respectively. This apparent discrepancy could result from the varied composition of the OutD derivatives used in these studies, the N0-N1 domains and the isolated N0 domain, respectively (32, 33). Indeed, in the N0-N1 derivative, strand $\beta 3^{N0}$, is involved in the N0/N1 interface and interacts with $\beta 6^{N1}$ (26, 32), and consequently, it is not well accessible for an interaction with HR. Alternatively, the different affinities of N0 for HR in the *Vibrio cholerae* and *D. dadantii* proteins could be the origin of the discrepancy. Finally, dissimilar experimental approaches used in different studies can also contribute to the data conflict. Indeed, this report and the previous pull-down analysis (8) indicate an HR-N2 interaction ($\beta 7^{HR}$ - $\beta 10^{N2}$); however, the recent NMR analysis (33) did not reveal any interaction of the HR domain with the isolated N1-N2 domains. Similarly, the recent systematic surface plasmon resonance analysis of the T2SS of *Pseudomonas aeruginosa* has indicated that the periplasmic region of GspC interacts with N3 but not with N0 domain of the cognate secretin (10). Once again, particular experimental approaches employed in this study (surface plasmon resonance and affinity chromatography) could be the cause. Alternatively, because the *P. aeruginosa* GspC and GspD is much more dissimilar from those of *D. dadantii* and *E. coli*, the observed discrepancies could reflect some subtle mechanistic differences between these T2SSs.

The OutC-OutD interactions, 2) $\beta 7^{HR}$ - $\beta 2^{N0}$ and 3) $\beta 7^{HR}$ - $\beta 10^{N2}$, involve the same site of HR ($\beta 7^{HR}$) and, hence, seem to be mutually incompatible (supplemental Fig. S6). In contrast,

interaction 1), $\beta 1^{\text{HR}}-\beta 1^{\text{N0}}$, seems to be compatible with the two others because it involves distinct sites of HR and N0 (supplemental Fig. S6, B and C). However, in the GspD crystal structure, $\beta 1^{\text{N0}}$ and $\beta 10^{\text{N2}}$ are far apart (Fig. 1D). Thus, even if steric constraints would allow a simultaneous interaction of HR with these two sites of OutD, this would necessitate substantial rearrangements of the periplasmic domains of OutD (supplemental Fig. S6B). Interactions 1) and 2) involve two opposite faces of the HR domain ($\beta 1^{\text{HR}}$ and $\beta 7^{\text{HR}}$) and two distinct sites of the N0 domain ($\beta 1^{\text{N0}}$ and $\beta 2^{\text{N0}}$) and, hence, they look spatially compatible with each other (supplemental Fig. S6C, left). However, the inner membrane components, OutE/L/M, have opposite effects on these interactions, reinforcing 2) but reducing 1) (supplemental Fig. S6C, right). Therefore, the three OutC-OutD interactions are not at all, or only poorly, compatible simultaneously, and this implies an alternation of their activity during the process of secretion.

In addition, the transient nature of various OutC-OutD interactions is suggested by the fact that the same sites of these proteins are also involved in self-interactions. For example, both OutC^{G99C} ($\beta 1^{\text{HR}}$) and OutD^{F34C} ($\beta 1^{\text{N0}}$) produce homodimers when expressed separately but, once combined, they create a heterodimer. Similarly, both OutD^{T53C} ($\beta 2^{\text{N0}}$) and OutD^{V232C} ($\beta 10^{\text{N2}}$) self-interact but also interact with OutC^{V153C} ($\beta 7^{\text{HR}}$). Thus, none of these interactions occurs through static interfaces. It is striking that disulfide self-bonding at positions involved in multiple interactions abolishes the protein function, e.g. OutD variants F34C, T53C, and V232C were all shown to be completely defective for secretion. In contrast, some OutD variants, which have not been shown to interact with OutC, are dimeric but remain functional (e.g. G190C and V241C), indicating that homodimerization of OutD *per se* may be compatible with the protein function.

Equivalent amounts of OutC-OutD complexes were observed with the three interacting sites, suggesting that they have a similar functional relevance. It seems, however, symptomatic that the extent of OutC-OutD cross-linking was rather low compared with that of self-bonding of the corresponding OutC and OutD variants. This suggests that self-interactions of HR and N0-N3 domains are more prevalent and could constitute the initial or "basal" interactions within the secretin, whereas heterogeneous contacts between these domains are transient and loose. Indeed, efficiency of disulfide cross-linking is dependent on the proximity and proper orientation of the sites studied but also on the prevalence of these contacts. Thus, the interactions representative of the "stand-by" state of the system would generate more efficient cross-linking than the transient, but functionally important, contacts.

Experiments with *E. coli* demonstrated that the equilibrium between various homo- and heterogeneous interactions could be altered by the presence of the secreted substrate and/or the inner membrane components. Co-expression of PelB with certain variants of OutC or OutD provoked effects suggesting direct interactions of the secreted substrate with these components and so, indicating some individual sites that are particularly affected by the secreted protein. More precisely, the quantity of homodimers and/or the total amount of OutD decreased significantly with T53C, G190C, V232C, V241C, and I272C

variants indicating that, in these positions, self-interactions between subunits of OutD are poorly compatible with the presence of PelB. The three-dimensional reconstruction of the GspD dodecameric complex assumes that the ring-like structures, formed by the N1 and N2 domains, constitute a vestibule in which the secretion substrate is loaded prior to being secreted, whereas the N3 domain builds up a form of constriction which closes the pore (20, 25). Thus, it seems reasonable that the secreted protein PelB affects multiple sites of the secretin. Remarkably, in the N0 domain, PelB apparently affects only one of the two self-interacting sites (supplemental Fig. S1C). This site, involving strand $\beta 2$ (Thr-53), could indicate a point of entry of the secretion substrate.

In addition, PelB provokes a striking effect on certain OutC variants, namely, it increases the self-bonding of L145C (supplemental Fig. S2C). This suggests that some local unfolding or β -strand switching occurs; i.e. PelB causes $\beta 6^{\text{HR}}$ strand to move out in the way that Leu-145 (buried in the HR structure) became accessible for disulfide cross-linking. This self-interaction was also observed in *D. dadantii*, and hence, it could indicate mode of interaction of the secreted substrate with HR. Indeed, the recent surface plasmon resonance analysis showed that the periplasmic region of the *P. aeruginosa* GspC interacts with the secreted substrate (10). Alternatively, it cannot be completely excluded that substitution of the hydrophobic Leu by nucleophilic Cys affects hydrophobic core of the HR domain and provokes such a behavior. However, analysis of the double and triple cysteine substitutions in HR shows that even multiple cysteine substitutions *per se* are well compatible with OutC function and, thus, do not affect drastically the folding of HR (supplemental text and supplemental Fig. S7).

The T2SS components OutE/L/M produce another significant effect on OutC, as they improve its dimerization via the $\beta 1^{\text{HR}}/\beta 1^{\text{HR}}$ (G99C) interface (supplemental Fig. S2C). Indeed, G99C generated three species on nonreducing gel, whereas the protein itself was not degraded (Fig. 3B). Because electrophoretic mobility of dimers dependent on their overall shape (see Fig. 2 legend), these species may correspond to three different conformations. In fact, Gly-99 is located on a tight bend of $\beta 1^{\text{HR}}$, and G99C mutant may have two conformations, named A and B. Next, they can generate AA, BB, AB, and BA dimers, where the two latter have the same shape. If this suggestion is true, the presence of OutE/L/M imposes only one conformation of G99C and, thus, only one type of dimers.

Certain other disulfide bonding patterns seem to be poorly consistent with the structural data; namely, both $\beta 1^{\text{N0}}-\beta 1^{\text{N0}}$ and $\beta 1^{\text{N0}}-\beta 1^{\text{HR}}$ interactions involve Phe-34. This residue, however, appears as buried on the OutD model (Fig. 1D) and on the structure of isolated N0-N1-N2 domains from ETEC, which has been used as a template (Phe-34 corresponds to Phe-9 on PDB 3EZJ) (26). On the other hand, in the structure of the HR/N0-N1 complex from ETEC (PDB 3OSS) (32), $\beta 1^{\text{N0}}$ forms a mixed β -sheet with $\beta 1^{\text{HR}}$ at the manner that the side chain of Phe-9 (Phe-34) is involved in the HR/N0 interface. Thus, the latter study shows that apparently buried Phe-34 remains accessible and suggests a way by which the side chains of two Phe-34 residues can interact in the $\beta 1^{\text{N0}}-\beta 1^{\text{N0}}$ interface presumed by disulfide bonding assays. This example can also illus-

GspC-GspD Disulfide Bonding Analysis

trate how some other buried residues, namely, L145C and L154C variants of OutC, may be involved in interdomain contacts.

Another rather unexpected observation may be drawn from this cysteine bonding analysis. Notably, homodimers were predominant with several of the OutD variants, both in *E. coli* and in *D. dadantii*. Such efficient self-bonding could not be straightforwardly attributed to the sporadic movements of the periplasmic domains of OutD because no dimers were observed with some variants (L127C and V271C), and cysteine substitutions of buried side chains generated significantly less homodimers than those of adjacent, but solvent-exposed, residues (e.g. V54C and I56C versus T53C and I55C). An efficient self-cross-linking of certain OutD variants indicates that the corresponding residues are close to the same residues of an adjacent OutD protomer (e.g. Phe-34 to Phe-34, Thr-53 to Thr-53, Val-232 to Val-232, etc.) and also suggests a juxtaposition of the corresponding structural elements ($\beta 1$ to $\beta 1$, $\beta 2$ to $\beta 2$, $\beta 10$ to $\beta 10$, etc.) (supplemental Fig. S1). Such an arrangement of adjacent OutD domains is poorly compatible with C12 rotational symmetry suggested for the GspD dodecamer (20, 26), which implies the same arrangement of each OutD subunit. In the latter case, the distance between the equivalent side chains and their mutual orientation would not allow for an efficient self-bonding of OutD. Our data therefore suggest an alternative organization of the OutD subunits. The equivalent periplasmic domains of two adjacent OutD protomers may be arranged with 2-fold symmetry to allow for proximity and the appropriate orientation of the equivalent structural elements. Similarly, cysteine bonding analysis of the HR domain suggests a juxtaposition of two neighboring OutC protomers, either via the $\beta 1$ - $\beta 1$ self-interaction (G99C) or via substrate-induced contacts of strands $\beta 6$ and $\beta 7$ (L145C and L154C, respectively) (supplemental Fig. S1B). Once again, a 2-fold arrangement of each pair of OutC subunits would account for the observed disulfide-linked species. Interestingly, initially the GspE hexamer was also modeled with P6 symmetry, assuming the same conformation for each GspE subunit (39). However, based on the recent structural data on PilT, a GspE ortholog from the T4P (40), a C2 hexameric model of GspE was generated which involves three different conformations of the GspE subunits (41). It is, therefore, plausible that the GspD and GspC subunits could also have different conformations within the secreton, compatible with a high level of disulfide self-bonding of various cysteine variants. Consequently, the periplasmic domains of the GspD dodecamer may be arranged as a hexamer of dimers (6-fold rotational symmetry) rather than a dodecamer with 12-fold rotational symmetry (supplemental Fig. S1A). The same arrangement might extend to the GspC subunits. Moreover, considering the transient nature of many of the interactions, elucidated in this study, such conformations could also be transient, varying according to the interactions with other T2SS components and/or secreted proteins.

Acknowledgments—We are grateful to Beatrice Py for the OutE/L/M plasmid, to Xavier Robert, for OutD modeling, and to Guy Condemine, for reading the manuscript.

REFERENCES

- Filloux, A. (2004) The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**, 163–179
- Cianciotto, N. P. (2005) Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol.* **13**, 581–588
- Py, B., Loiseau, L., and Barras, F. (2001) An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. *EMBO Rep.* **2**, 244–248
- Tsai, R. T., Leu, W. M., Chen, L. Y., and Hu, N. (2002) A reversibly dissociable ternary complex formed by XpsL, XpsM, and XpsN of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus. *Biochem. J.* **367**, 865–871
- Lee, H. M., Chen, J. R., Lee, H. L., Leu, W. M., Chen, L. Y., and Hu, N. T. (2004) Functional dissection of the XpsN (GspC) protein of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion machinery. *J. Bacteriol.* **186**, 2946–2955
- Robert, V., Filloux, A., and Michel, G. P. (2005) Subcomplexes from the Xcp secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **252**, 43–50
- Korotkov, K. V., Krumm, B., Bagdasarian, M., and Hol, W. G. (2006) Structural and functional studies of EpsC, a crucial component of the type 2 secretion system from *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* **363**, 311–321
- Login, F. H., Fries, M., Wang, X., Pickersgill, R. W., and Shevchik, V. E. (2010) A 20-residue peptide of the inner membrane protein OutC mediates interaction with two distinct sites of the outer membrane secretin OutD and is essential for the functional type II secretion system in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **76**, 944–955
- Bouley, J., Condemine, G., and Shevchik, V. E. (2001) The PDZ domain of OutC and the N-terminal region of OutD determine the secretion specificity of the type II out pathway of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Mol. Biol.* **308**, 205–219
- Douzi, B., Ball, G., Cambillau, C., Tegoni, M., and Voulhoux, R. (2011) Deciphering the Xcp *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion machinery through multiple interactions with substrates. *J. Biol. Chem.* **286**, 40792–40801
- Johnson, T. L., Abendroth, J., Hol, W. G., and Sandkvist, M. (2006) Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**, 175–186
- Hardie, K. R., Lory, S., and Pugsley, A. P. (1996) Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J.* **15**, 978–988
- Shevchik, V. E., and Condemine, G. (1998) Functional characterization of the *Erwinia chrysanthemi* OutS protein, an element of a type II secretion system. *Microbiology* **144**, 3219–3228
- Gu, S., Rehman, S., Wang, X., Shevchik, V. E., and Pickersgill, R. W. (2012) Structural and functional insights into the pilotin-secretin complex of the type II secretion system. *PLoS Pathog.* **8**, e1002531
- Opalka, N., Beckmann, R., Boisset, N., Simon, M. N., Russel, M., and Darst, S. A. (2003) Structure of the filamentous phage pIV multimer by cryoelectron microscopy. *J. Mol. Biol.* **325**, 461–470
- Hodgkinson, J. L., Horsley, A., Stabat, D., Simon, M., Johnson, S., da Fonseca, P. C., Morris, E. P., Wall, J. S., Lea, S. M., and Blocker, A. J. (2009) Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 477–485
- Burkhardt, J., Vonck, J., and Averhoff, B. (2011) Structure and function of PilQ, a secretin of the DNA transporter from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *J. Biol. Chem.* **286**, 9977–9984
- Korotkov, K. V., Gonen, T., and Hol, W. G. (2011) Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 433–443
- Collins, R. F., Frye, S. A., Kitmitto, A., Ford, R. C., Tønnum, T., and Derrick, J. P. (2004) Structure of the *Neisseria meningitidis* outer membrane PilQ secretin complex at 12 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **279**, 39750–39756
- Reichow, S. L., Korotkov, K. V., Hol, W. G., and Gonen, T. (2010) Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1226–1232
- Jain, S., Mościcka, K. B., Bos, M. P., Pachulec, E., Stuart, M. C., Keegstra,

- W., Boekema, E. J., and van der Does, C. (2011) Structural characterization of outer membrane components of the type IV pili system in pathogenic *Neisseria*. *PLoS One* **6**, e16624
22. Nouwen, N., Stahlberg, H., Pugsley, A. P., and Engel, A. (2000) Domain structure of secretin PulD revealed by limited proteolysis and electron microscopy. *EMBO J.* **19**, 2229–2236
 23. Chami, M., Guilvout, I., Gregorini, M., Rémy, H. W., Müller, S. A., Valerio, M., Engel, A., Pugsley, A. P., and Bayan, N. (2005) Structural insights into the secretin PulD and its trypsin-resistant core. *J. Biol. Chem.* **280**, 37732–37741
 24. Shevchik, V. E., Robert-Baudouy, J., and Condemine, G. (1997) Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of the general secretory pathway, and secreted proteins. *EMBO J.* **16**, 3007–3016
 25. Reichow, S. L., Korotkov, K. V., Gonen, M., Sun, J., Delarosa, J. R., Hol, W. G., and Gonen, T. (2011) The binding of cholera toxin to the periplasmic vestibule of the type II secretion channel. *Channels* **5**, 215–218
 26. Korotkov, K. V., Pardon, E., Steyaert, J., and Hol, W. G. (2009) Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody. *Structure* **17**, 255–265
 27. Kanamaru, S., Leiman, P. G., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F., and Rossmann, M. G. (2002) Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. *Nature* **415**, 553–557
 28. Yip, C. K., Kimbrough, T. G., Felise, H. B., Vuckovic, M., Thomas, N. A., Pfuetzner, R. A., Frey, E. A., Finlay, B. B., Miller, S. I., and Strynadka, N. C. (2005) Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* **435**, 702–707
 29. Thomas, J. D., Reeves, P. J., and Salmond, G. P. (1997) The general secretion pathway of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: analysis of the membrane topology of OutC and OutF. *Microbiology* **143**, 713–720
 30. Peabody, C. R., Chung, Y. J., Yen, M. R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A. P., and Saier, M. H. (2003) Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology* **149**, 3051–3072
 31. Login, F. H., and Shevchik, V. E. (2006) The single transmembrane segment drives self-assembly of OutC and the formation of a functional type II secretion system in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Biol. Chem.* **281**, 33152–33162
 32. Korotkov, K. V., Johnson, T. L., Jobling, M. G., Pruneda, J., Pardon, E., Héroux, A., Turley, S., Steyaert, J., Holmes, R. K., Sandkvist, M., and Hol, W. G. (2011) Structural and functional studies on the interaction of GspC and GspD in the type II secretion system. *PLoS Pathog.* **7**, e1002228
 33. Gu, S., Kelly, G., Wang, X., Frenkiel, T., Shevchik, V. E., and Pickersgill, R. W. (2012) Solution structure of homology region (HR) domain of type II secretion system. *J. Biol. Chem.* **287**, 9072–9080
 34. Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M. Y., Pieper, U., and Sali, A. (2007) Comparative protein structure using MODELLER. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Chapter 2, Unit 2.9
 35. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283–291
 36. Remaut, H., and Waksman, G. (2006) Protein-protein interaction through β -strand addition. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 436–444
 37. Possot, O. M., Vignon, G., Bomchil, N., Ebel, F., and Pugsley, A. P. (2000) Multiple interactions between pullulanase secretin components involved in stabilization and cytoplasmic membrane association of PulE. *J. Bacteriol.* **182**, 2142–2152
 38. Gérard-Vincent, M., Robert, V., Ball, G., Bleves, S., Michel, G. P., Lazdunski, A., and Filloux, A. (2002) Identification of XcpP domains that confer functionality and specificity to the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion apparatus. *Mol. Microbiol.* **44**, 1651–1665
 39. Robien, M. A., Krumm, B. E., Sandkvist, M., and Hol, W. G. (2003) Crystal structure of the extracellular protein secretion NTPase EpsE of *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* **333**, 657–674
 40. Misić, A. M., Satyshur, K. A., and Forest, K. T. (2010) *P. aeruginosa* PilT structures with and without nucleotide reveal a dynamic type IV pilus retraction motor. *J. Mol. Biol.* **400**, 1011–1021
 41. Patrick, M., Korotkov, K. V., Hol, W. G., and Sandkvist, M. (2011) Oligomerization of EpsE coordinates residues from multiple subunits to facilitate ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **286**, 10378–10386
 42. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Charaoui-Boukerzaza, S. (2009) Catabolism of raffinose, sucrose, and melibiose in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **191**, 6960–6967
 43. Dykxhoorn, D. M., St Pierre, R., and Linn, T. (1996) A set of compatible tac promoter expression vectors. *Gene* **177**, 133–136
 44. Chang, A. C., and Cohen, S. N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**, 1141–1156
 45. Py, B., Loiseau, L., and Barras, F. (1999) Assembly of the type II secretion machinery of *Erwinia chrysanthemi*: direct interaction and associated conformational change between OutE, the putative ATP-binding component and the membrane protein OutL. *J. Mol. Biol.* **289**, 659–670

Table S1. Plasmids expressing cysteine variants of OutC and OutD used in this study

Plasmid	Expressed genes	Reference
Vectors expressing OutC variants under the control of PpelC		
pTdB-oC _{G99C}	outC (G99C)	(33)
pTdB-oC _{V100C}	outC (V100C)	(33)
pTdB-oC _{I113C}	outC (I113C)	(33)
pTdB-oC _{V143C}	outC (V143C)	(33)
pTdB-oC _{V144C}	outC (V144C)	This work
pTdB-Oc _{L145C}	outC (L145C)	This work
pTdB-oC _{Y151C}	outC (Y151C)	This work
pTdB-oC _{V153C}	outC (V153C)	This work
pTdB-oC _{L154C}	outC (L154C)	This work
Vectors expressing OutD variants under the control of PpelC		
pTdB-oD _{S33C}	outD (S33C)	This work
pTdB-oD _{F34C}	outD (F34C)	This work
pTdB-oD _{T53C}	outD (T53C)	This work
pTdB-oD _{V54C}	outD (V54C)	This work
pTdB-oD _{I55C}	outD (I55C)	This work
pTdB-oD _{I56C}	outD (I56C)	This work
pTdB-oD _{I64C}	outD (I64C)	This work
pTdB-oD _{S65C}	outD (S65C)	This work
pTdB-oD _{L127C}	outD (L127C)	This work
pTdB-oD _{G190C}	outD (G190C)	This work
pTdB-oD _{V232C}	outD (V232C)	This work
pTdB-oD _{V241C}	outD (V241C)	This work
pTdB-oD _{V271C}	outD (V271C)	This work
pTdB-oD _{I272C}	outD (I272C)	This work
Vectors coexpressing OutC and OutD cysteine variants under the control of PpelC		
pTdB-oC _{G99C} oD _{S33C}	outC (G99C) and outD (S33C)	This work
pTdB-oC _{G99C} oD _{F34C}	outC (G99C) and outD (F34C)	This work
pTdB-oC _{V100C} oD _{S33C}	outC (V100C) and outD (S33C)	This work
pTdB-oC _{V100C} oD _{F34C}	outC (V100C) and outD (F34C)	This work
pTdB-oC _{G99C} oD _{I64C}	outC (G99C) and outD (I64C)	(33)
pTdB-oC _{G99C} oD _{S65C}	outC (G99C) and outD (S65C)	(33)
pTdB-oC _{V100C} oD _{I64C}	outC (V100C) and outD (I64C)	(33)
pTdB-oC _{V100C} oD _{S65C}	outC (V100C) and outD (S65C)	(33)

Supplemental data GspC-GspD disulfide-bonding analysis

pTdB-oC _{V143C} oD _{T53C}	outC (V143C) and outD (T53C)	This work
pTdB-oC _{V143C} oD _{V54C}	outC (V143C) and outD (V54C)	This work
pTdB-oC _{V143C} oD _{V271C}	outC (V143C) and outD (V271C)	This work
pTdB-oC _{V143C} oD _{I272C}	outC (V143C) and outD (I272C)	This work
pTdB-oC _{V144C} oD _{T53C}	outC (V144C) and outD (T53C)	This work
pTdB-oC _{V144C} oD _{V54C}	outC (V144C) and outD (V54C)	This work
pTdB-oC _{V144C} oD _{V232C}	outC (V144C) and outD (V232C)	This work
pTdB-oC _{V144C} oD _{V271C}	outC (V144C) and outD (V271C)	This work
pTdB-oC _{V144C} oD _{I272C}	outC (V144C) and outD (I272C)	This work
pTdB-oC _{Y151C} oD _{T53C}	outC (Y151C) and outD (T53C)	This work
pTdB-oC _{Y151C} oD _{I55C}	outC (Y151C) and outD (I55C)	This work
pTdB-oC _{V153C} oD _{T53C}	outC (V153C) and outD (T53C)	This work
pTdB-oC _{V153C} oD _{V54C}	outC (V153C) and outD (V54C)	This work
pTdB-oC _{V153C} oD _{I55C}	outC (V153C) and outD (I55C)	This work
pTdB-oC _{V153C} oD _{I56C}	outC (V153C) and outD (I56C)	This work
pTdB-oC _{V153C} oD _{V232C}	outC (V153C) and outD (V232C)	This work
pTdB-oC _{V153C} oD _{V241C}	outC (V153C) and outD (V241C)	This work
pTdB-oC _{V153C} oD _{V271C}	outC (V153C) and outD (V271C)	This work
pTdB-oC _{V153C} oD _{I272C}	outC (V153C) and outD (I272C)	This work
pTdB-oC _{L154C} oD _{T53C}	outC (L154C) and outD (T53C)	This work
pTdB-oC _{L154C} oD _{V54C}	outC (L154C) and outD (T54C)	This work
pTdB-oC _{L154C} oD _{I55C}	outC (L154C) and outD (I55C)	This work
Vectors coexpressing PelB with OutC and OutD cysteine variants under the control of PpelC		
pTPLB-oC _{V144C} oD _{T53C}	pelB followed by outC (V144C) and outD (T53C)	This work
pTPLB-oC _{V144C} oD _{V232C}	pelB followed by outC (V144C) and outD (V232C)	This work
pTPLB-oC _{V144C} oD _{V241C}	pelB followed by outC (V144C) and outD (V241C)	This work
pTPLB-oC _{V144C} oD _{V271C}	pelB followed by outC (V144C) and outD (V271C)	This work
pTPLB-oC _{V144C} oD _{I272C}	pelB followed by outC (V144C) and outD (I272C)	This work
pTPLB-oC _{V144C} oD _{I272C}	pelB followed by outC (V144C) and outD (I272C)	This work
pTPLB-oC _{V153C} oD _{T53C}	pelB followed by outC (V153C) and outD (T53C)	This work
pTPLB-oC _{V153C} oD _{V54C}	pelB followed by outC (V153C) and outD (V54C)	This work
pTPLB-oC _{V153C} oD _{I55C}	pelB followed by outC (V153C) and outD (I55C)	This work
pTPLB-oC _{V153C} oD _{V232C}	pelB followed by outC (V153C) and outD (V232C)	This work
pTPLB-oC _{V153C} oD _{V241C}	pelB followed by outC (V153C) and outD (V241C)	This work
pTPLB-oC _{V153C} oD _{V271C}	pelB followed by outC (V153C) and outD (V271C)	This work
pTPLB-oC _{V153C} oD _{I272C}	pelB followed by outC (V153C) and outD (I272C)	This work
pTPLB-oC _{L154C} oD _{T53C}	pelB followed by outC (L154C) and outD (T53C)	This work
pTPLB-oC _{L154C} oD _{V54C}	pelB followed by outC (L154C) and outD (V54C)	This work

Table S2. Primers employed in the study

Primer	Nucleotide sequence (5'–3') ^b	Generated mutation
OuCV144C ^a	cgatccggccgatagagt gtgc ctgcagtatcaagggcggttatg	OutCV144C
OuCL145C ^a	ccggccgggatagagtgg gtgtgc ctgcagtatcaagggcggttatgaag	OutCL145C
OuCY151C ^a	gtgcagtatcaagggcg gtgtgc taagtgcgggattgtacagc	OutCY151C
OuCV153C ^a	cagtataagggcggttatgaat gtgtgc taagtgcgggattgtacagccaggag	OutCV153C
OuCL154C ^a	gtatcaagggcggttatgaagt gtgtgc taagtgcgggattgtacagccaggagg	OutCL154C
OuDS33C ^a	gggctgccgaatttcagcc ctgtgtgc taagtgcgggattgtacagccaggagg	OutCS33C
OuDF34C	gctgccgaatttcagccag gtgtgc taagtgcgggattgtacagccaggagg	OutDF34C
OuDT53C ^a	gtcagtaaaaacctgaacaa atgtgc taagtgcgggattgtacagccaggagg	OutDT53C
OuDv54C ^a	cagtaaaaacctgaacaa atgtgc taagtgcgggattgtacagccaggagg	OutDV54C
OuDI55C ^a	aacctgaacaa atgtgc taagtgcgggattgtacagccaggagg	OutDI55C
OuDI56C ^a	cctgaacaa atgtgc taagtgcgggattgtacagccaggagg	OutDI56C
OutDG190C ^a	caatacgggtggacaagac ctgtgc taagtgcgggattgtacagccaggagg	OutDG190C
OuDv232C ^a	ccaagcaccatgctggcta acgtgtgc taagtgcgggattgtacagccaggagg	OutDV232C
OuDv241C ^a	cggatggccgcaccaactct gtgtgc taagtgcgggattgtacagccaggagg	OutDV241C
OuDv271C ^a	gtggtgcaggcggaaccaag gtgtgc taagtgcgggattgtacagccaggagg	OutDV271C
OuDI272C ^a	gtgcaggcggaaccaag gtgtgc taagtgcgggattgtacagccaggagg	OutDI272C
OuDT53A ^a	gtcagtaaaaacctgaacaa atgtgc taagtgcgggattgtacagccaggagg	OutDT53A
OuDv232A ^a	ccaagcaccatgctggcta acgtgtgc taagtgcgggattgtacagccaggagg	OutDV232A
OutC	gccagagcatgaatatcgtg	
ROutC	gaactcctgaatatcggttc	

^a For each primers used in site directed mutagenesis, another primer with reverse complementary sequence was used (not shown). ^b Mutated or introduced bases are in bold.

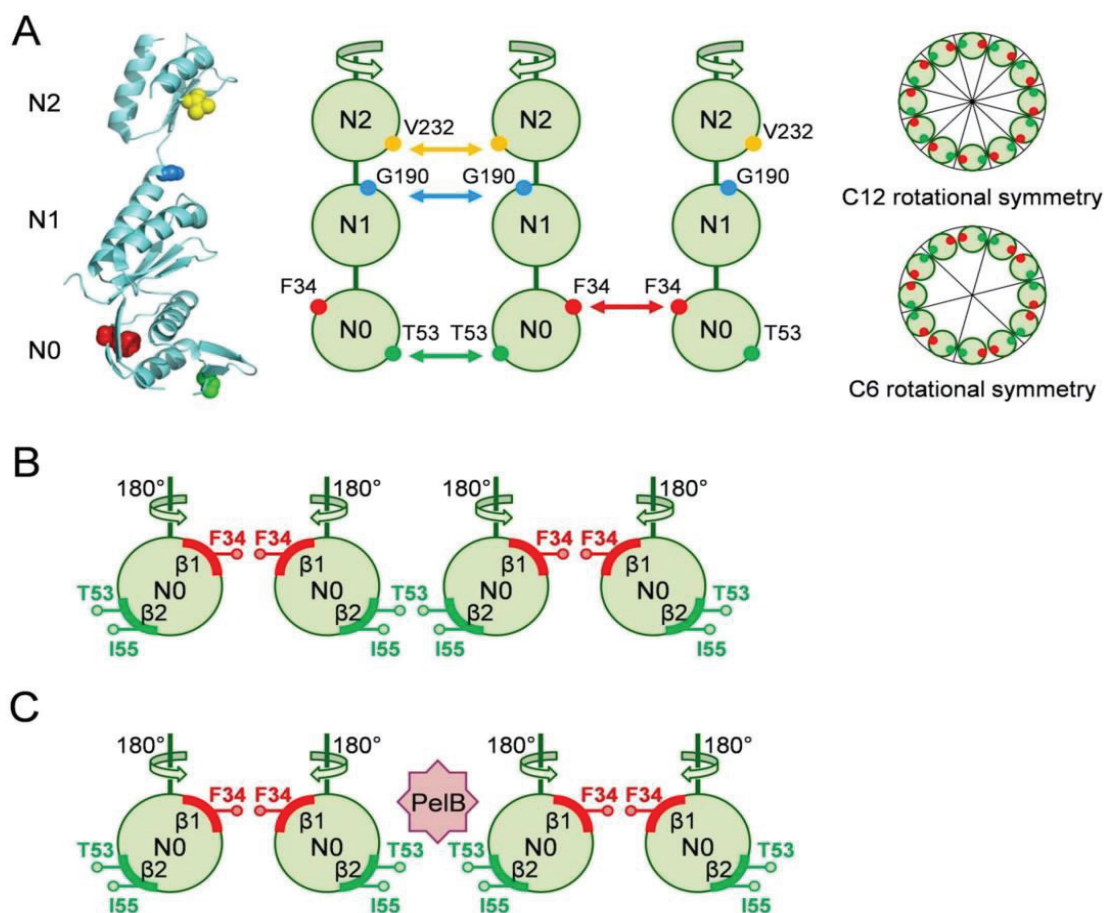


Figure S1. Schematic representation of the N0-N0 self-interactions detected in this study.

A. The 3D structure and schematic representation of N0-N1-N2 domains of OutD. An efficient self-cross-linking of certain OutD variants (colored dots) indicates that the corresponding residues are close to the equivalent residues of an adjacent OutD subunit. Such an arrangement of adjacent OutD domains is not compatible with C12 rotational symmetry assumed for the GspD dodecamer, which implies the same arrangement of each OutD protomer. The disulfide-bonding data suggest the equivalent domains of two adjacent OutD protomers may be arranged with two-fold symmetry to allow for proximity of the equivalent structural elements (arrows of corresponding colors). Thus, the periplasmic domains of the GspD dodecamer may be arranged as a hexamer of dimers with C6 rotational symmetry. **B.** Two adjacent N0 domains can interact through two opposing sites, one including the solvent exposed face of the strand β2 (T53 and I55) and another including the strand β1 (F34). Disulfide self-bonding at each of these positions completely abolishes secretion suggesting a transient nature of these self-interactions. **C.** The presence of secreted substrate (PelB) decreases the β2-β2 contact but has no apparent effect on the β1-β1 self-interaction.

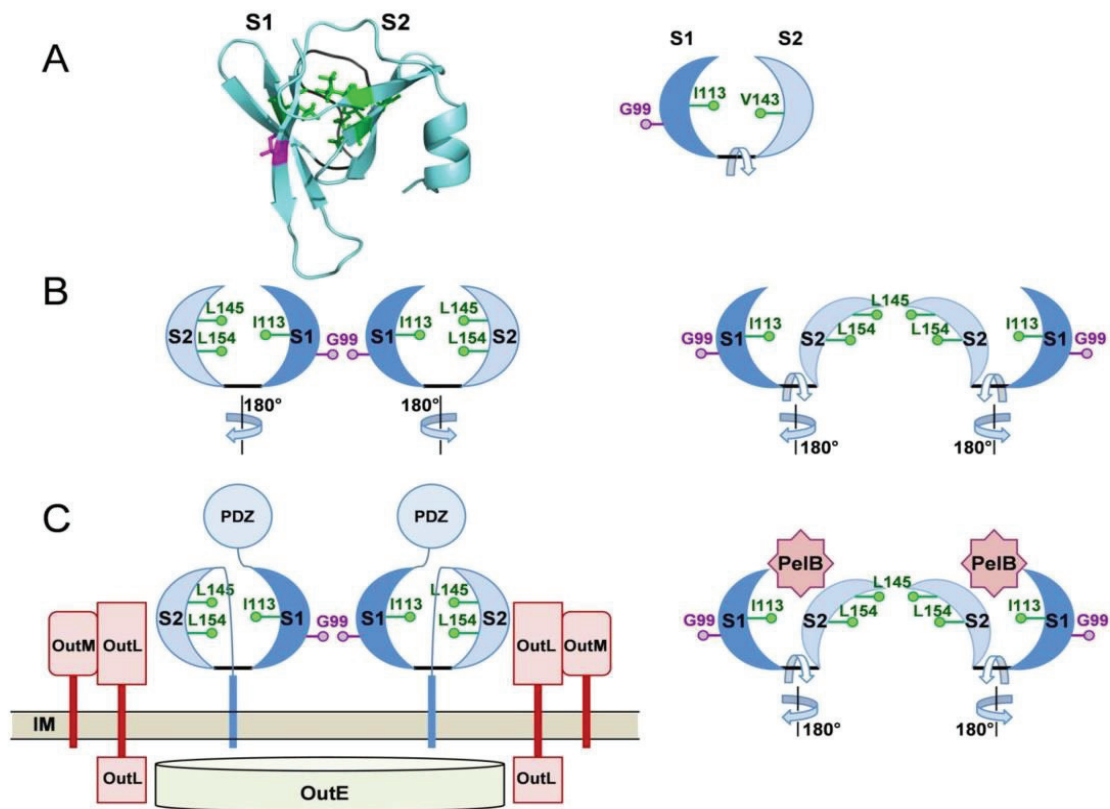


Figure S2. Schematic representation of the HR-HR self-interactions detected in this study.

A. The HR domain adopts a β -sandwich-like fold consisting of two β -sheets (S1 and S2) each composed of three anti-parallel β -strands. The two β -sheets seem to be largely independent but connected by several hydrophobic contacts, namely I113 and V143; they are attached by an extended linker (in black). **B.** Neighboring HR domains can interact through two opposite sites, one including the solvent exposed face of the first β -sheet (G99C, $\beta 1^{HR}$) and the other involving the side chains of L145 and L154 ($\beta 6^{HR}$ and $\beta 7^{HR}$, respectively) that are, however, buried in the HR structure. **C.** The presence of OutE/L/M improves the efficiency of OutC homodimerization via the $\beta 1^{HR}$ - $\beta 1^{HR}$ interface (G99) while the secreted substrate PelB reinforces dimerization of OutC through the interface, formed by L145. This suggests that some local unfolding or β -strand switching occurs; i.e. PelB causes $\beta 6^{HR}$ strand to move out in the way that L145 (buried in the HR structure) became accessible for disulfide cross-linking. This self-interaction was also observed in *D. dadantii* and, hence, it could indicate mode of interaction of the secreted substrate with HR.

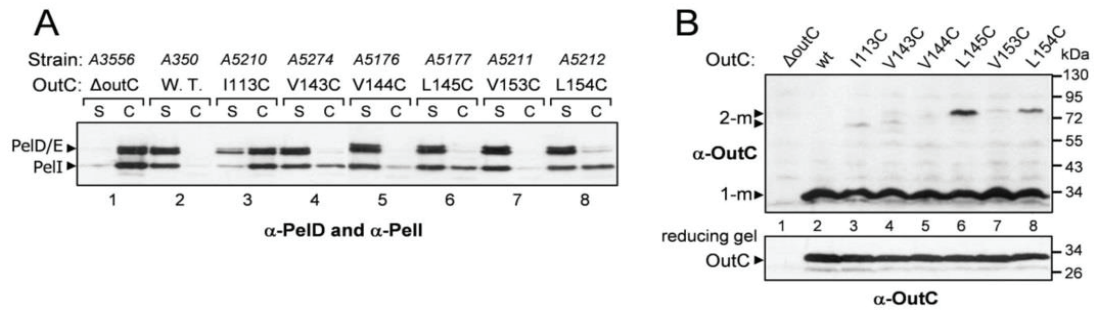


Figure S3. Functionality and disulfide-bonding patterns of *D. dadantii* strains carrying a chromosomal cysteine variant of OutC.

A. Secretion activity of the mutant strains. The *D. dadantii* strains, carrying a chromosomal mutant outC allele (indicated on top), were grown aerobically to steady-state and then culture supernatant (s) and cells (c) were separated and analyzed by immunoblotting with PelD and PelI-antibodies. The quantity of secreted proteins present in the culture supernatant reflects the efficiency of secretion. **B.** Disulfide-bonding analysis of the mutant strains. Cells from the same cultures as in A were treated with iodoacetamide to block any remaining free thiol groups and the extent of disulfide bonding was assessed using non-reducing SDS-PAGE, followed by immunoblotting with OutC-antibodies. To estimate the amounts of OutC loaded onto the gel, the same samples were analyzed in reducing conditions with 2-mercaptoethanol (lower panel). An equivalent amount of cells was loaded into each well. The positions of OutC monomers (1-m) and dimers (2-m) are indicated by arrowheads.

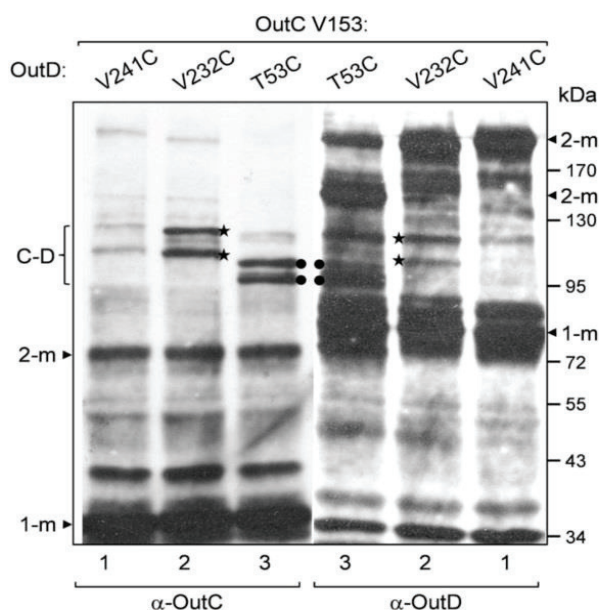


Figure S4. Analysis of the OutC-OutD complexes with OutC- and OutD-antibodies.

OutCV153C was combined with various OutD variants (indicated on top) and their disulfide-bonding patterns were probed with either OutC (left panel) or OutD (right panel) antibodies. *E. coli* NM522/pACoS (outS+) cells carrying a pTdB-oCoD plasmid co-expressing mutant alleles of outC and outD were grown aerobically to steady-state. Remaining free thiol groups were blocked with iodoacetamide and the extent of disulfide bonding was assessed by non-reducing SDS-PAGE followed by immunoblotting. The positions of OutC and OutD monomers (1-m), dimers (2-m) and OutC-OutD complexes are indicated by arrowheads and brackets. The complexes visualized by both antibodies are indicated by dots or asterisks. The OutC-OutD complexes were formed with OutCV153C/OutDT53C and OutCV153C/OutDV232C (lanes 3 and 2) but not with OutCV153C/OutDV241C (lanes 1). Note that the OutD homodimers formed by T53C (proximal to the N-terminus) migrated faster than that of V232C and V241C (located in the middle portion).

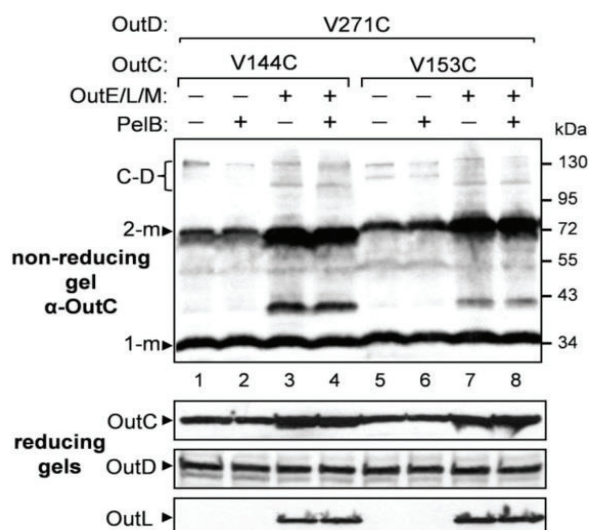


Figure S5. The T2SS components OutE/L/M improve homodimerization and stability of OutC.

E. coli NM522/pACoS (outS+) cells, carrying either a pTdB-oCoD (pelB-) or a pTPLB-oCoD (pelB+) plasmid co-expressing mutant alleles of outC and outD (indicated on top) and either an empty pBAD18 vector or a pBAD-ELM (outE/L/M+), were grown aerobically to steady-state. Remaining free thiol groups were blocked with iodoacetamide and the extent of disulfide bonding was assessed by non-reducing SDS-PAGE followed by immunoblotting with OutC-antibodies (upper panel). An equivalent amount of cells was loaded into each well. The positions of monomers (1-m) and dimers (2-m) of OutC are indicated by arrowheads and the OutC-OutD complex is shown by a bracket. To estimate amounts of OutC, OutD and OutL, the same samples were analyzed in reducing conditions (lower panels).

In the presence of OutE/L/M, the quantity of OutC and of OutC homodimers increased but that of OutD was not affected. Note, that these variant combinations generate only trace amounts of OutC-OutD complexes.

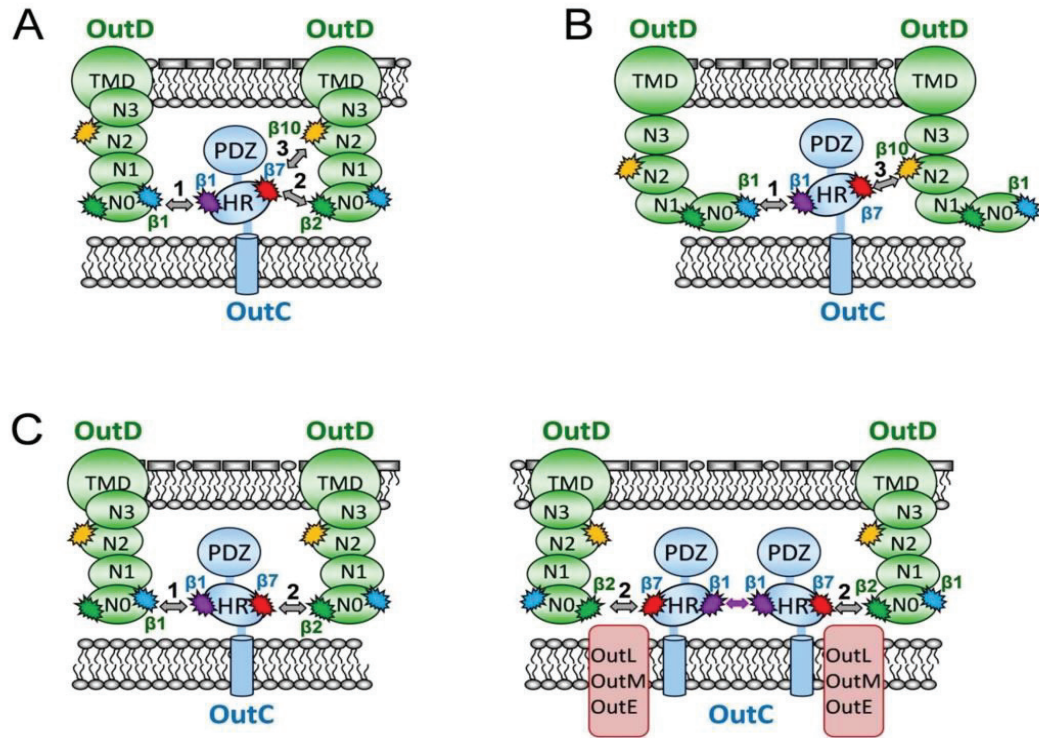


Figure S6. Schematic representation of the HR-OutD interactions detected in this study.

A. The disulfide bonding analysis indicates at least three OutC-OutD interacting sites, 1) $\beta 1^{\text{HR}}-\beta 1^{\text{N0}}$, 2) $\beta 7^{\text{HR}}-\beta 2^{\text{N0}}$ and 3) $\beta 7^{\text{HR}}-\beta 10^{\text{N2}}$. This model ignores the actual homodimerization of each of the interacting partners (see Figures S1 and S2). The interactions 2) and 3) involve the same site of HR ($\beta 7^{\text{HR}}$) and, hence, seem to be mutually incompatible. **B.** In the GspD crystal structure, $\beta 1^{\text{N0}}$ and $\beta 10^{\text{N2}}$ are far apart (Fig. 1B). Thus, even if steric constraints would allow a simultaneous interaction of HR with these two sites of OutD, this would necessitate substantial rearrangements of the periplasmic domains of OutD. **C.** The interactions 1) and 2) involve two opposite faces of the HR domain ($\beta 1^{\text{HR}}$ and $\beta 7^{\text{HR}}$) and two distinct sites of the N0 domain ($\beta 1^{\text{N0}}$ and $\beta 2^{\text{N0}}$) and, hence, they look spatially compatible with each other (left panel). However, OutE/L/M have opposite effects on these interactions, reinforcing 2) but reducing 1). The latter effect is consistent with the fact that the $\beta 1^{\text{HR}}-\beta 1^{\text{HR}}$ self-interaction of the HR domain is improved in these conditions (right panel). Consequently, the $\beta 1^{\text{HR}}$ site becomes inaccessible for any interaction with $\beta 1^{\text{N0}}$. Therefore, the three OutC-OutD interactions are not at all, or only poorly, compatible simultaneously and this implies an alternation of their activity during the process of secretion.

least one intramolecular disulfide bond involving I113C (Fig. S7A, lane 10 and S7B, lane 4). Indeed, this variant did not form homodimers characteristic of I113C. Unexpectedly, the triple I113C/V144C/V153C mutant became functional (Fig. S7A, lane 11). Remarkably, similar to the single I113C mutant, a certain quantity of homodimer was detected with this triple mutant (Fig. S7B, lanes 2 and 5), indicating that sulfhydryl of I113C becomes available for homodimerization and, hence, it is not involved in an intramolecular bonding.

The following explanation of these data can be provided. Formation of an intramolecular disulfide bond between I113C and either V143C, or V144C, or V153C fully arrests the OutC function. It is the case for all the tested combination except I113C/V144C/V153C. In the latter, the solvent exposed side-chains of V144C and V153C ($\beta 6$ and $\beta 7$, respectively) are proximal and hence, form an intramolecular disulfide bond (V144C-V153C), which is

functionally tolerated. Consequently, the sulfhydryl of I113C becomes free, as judged by the formation of some amount of I113C homodimers. In consequence, functionality of this triple mutant is improved in comparison with the related double mutants. In contrast, in the triple I113C/V143C/V153C mutant, I113C is fully engaged in a more proficient intramolecular bonding with the buried V143C. Indeed, the side chains of V143C (buried) and V153C (solvent exposed) are distant and, hence, not able to form an intramolecular bond. Thus, these results are mostly compatible with the HR structure but show a certain flexibility of the strands $\beta 6$ and $\beta 7$ since the corresponding side-chains can take alternative contacts, either inside or outside of the HR domain. Moreover, the case of I113C/V144C/V153C shows that even multiple cysteine substitutions per se are well compatible with the OutC function and thus, do not disturb significantly the HR folding.

Dynamic Interplay between the Periplasmic and Transmembrane Domains of GspL and GspM in the Type II Secretion System

Mathilde Lallemand^{2,3}, Frédéric H. Login^{1,3}, Natalia Guschinskaya^{1,3}, Camille Pineau^{2,3}, Géraldine Effantin³, Xavier Robert^{1,4}, Vladimir E. Shevchik^{1,2,3*}

1 Université Lyon 1, Lyon, France, **2** INSA-Lyon, Villeurbanne, France, **3** CNRS, UMR5240, Microbiologie Adaptation et Pathogénie, Lyon, France, **4** Laboratory for Biocrystallography and Structural Biology of Therapeutic Targets, Molecular and Structural Bases of Infectious Diseases, CNRS UMR5086, Lyon, France

Abstract

The type II secretion system (T2SS) is a multiprotein nanomachine that transports folded proteins across the outer membrane of gram-negative bacteria. The molecular mechanisms that govern the secretion process remain poorly understood. The inner membrane components GspC, GspL and GspM possess a single transmembrane segment (TMS) and a large periplasmic region and they are thought to form a platform of unknown function. Here, using two-hybrid and pull-down assays we performed a systematic mapping of the GspC/GspL/GspM interaction regions in the plant pathogen *Dickeya dadantii*. We found that the TMS of these components interact with each other, implying a complex interaction network within the inner membrane. We also showed that the periplasmic, ferredoxin-like, domains of GspL and GspM drive homo- and heterodimerizations of these proteins. Disulfide bonding analyses revealed that the respective domain interfaces include the equivalent secondary-structure elements, suggesting alternating interactions of the periplasmic domains, L/L and M/M versus L/M. Finally, we found that displacements of the periplasmic GspM domain mediate coordinated shifts or rotations of the cognate TMS. These data suggest a plausible mechanism for signal transmission between the periplasmic and the cytoplasmic portions of the T2SS machine.

Citation: Lallemand M, Login FH, Guschinskaya N, Pineau C, Effantin G, et al. (2013) Dynamic Interplay between the Periplasmic and Transmembrane Domains of GspL and GspM in the Type II Secretion System. PLoS ONE 8(11): e79562. doi:10.1371/journal.pone.0079562

Editor: Eric Cascales, Centre National de la Recherche Scientifique, Aix-Marseille Université, France

Received: July 19, 2013; **Accepted:** September 24, 2013; **Published:** November 1, 2013

Copyright: © 2013 Lallemand et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-2010-BLANC-1531) and a grant from LyonBioPole to V.E.S. C.P. was supported by the ANR-2010-BLANC-1531 grant. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: vladimir.shevchik@insa-lyon.fr

© These authors contributed equally to this work.

Introduction

The type II secretion system is a sophisticated multiprotein machine that promotes the secretion of folded proteins and protein multimers from the periplasm through the outer membrane into the external medium or host tissues. The T2SS is widespread among γ -proteobacteria and is also found in α -, β - and δ -proteobacteria [1]. However, functional and structural studies of the T2SS have mostly been performed on only a few bacterial species which are pathogenic for humans, animals, fish and plants [2,3]. The T2SS of the plant pathogenic bacterium *Dickeya dadantii* (formerly *Erwinia chrysanthemi*) secretes a dozen lytic enzymes, mainly pectinases [4]. The T2SS is called the Out system in *Dickeya* and in the related *Pectobacterium* genus (formerly *Erwinia carotovora*) but it is generically called the Gsp (General secretory pathway) in any

bacteria. The T2S machinery is composed of at least 12 conserved core elements, GspC to GspM and GspO, and it can be divided into three functional and structural blocks: the secretin, the multiprotein inner membrane (IM) platform, and the pilus-forming subunits. The secretin GspD forms dodecameric pore-like structures in the outer membrane through which the substrates can be translocated [5]. The N-terminal domains of GspD form a vestibule-like structure, in the periplasm, where the substrate can be docked prior to secretion [6,7]. In some bacteria, a specialized class of lipoproteins assists in the correct targeting and assembly of the secretins in the outer membrane [8–10]. The periplasmic domain of the secretin interacts with that of GspC, an inner membrane component of the T2SS [11–15]. GspC, together with the two other bitopic IM components, GspL and GspM, and a multispinning membrane protein GspF are thought to

constitute a complex of unknown stoichiometry, referred to as an IM platform [16]. The ATPase GspE is attached to the inner leaflet of the IM *via* interactions with the cytoplasmic domains of GspL and GspF [16–18]. GspE can provide the energy for the machine assembly or for the secretion itself, more probably, for the formation of a short pilus by the five pseudopilins GspG to GspK [19]. It is thought that this pilus pushes the secretion substrate through the secretin pore [20,21].

Many aspects of this hypothetical model remain elusive. Notably, it has been suggested that GspC, GspL, GspM, GspF, together with GspE, constitute an IM complex that could act as a platform for the assembly and anchoring of the pilus [16]. This platform has also been presumed to initiate signal transduction, pore gating and to provide and transmit the energy for protein secretion [2,3,16]. However, its exact function, as well as the mechanisms that govern the assembly of its components and their stoichiometry, still needs to be elucidated. GspC, GspL and GspM are bitopic IM proteins carrying a single transmembrane segment and a large periplasmic region. GspL and GspM have been found to form a stable binary complex that interacts with GspC and plays a key role in the stabilization of the IM platform [22–26]. Previous studies have shown that the periplasmic regions of GspL and GspM self-interact and interact with each other, while the cytoplasmic domain of GspL self-dimerizes and interacts with GspE [23,27–32]. Even though the exact position of the corresponding interaction sites is still uncertain depending on the bacteria and the approaches used, it is generally believed that the TMSs are not necessary for the interactions of these IM components. However, recent studies show that the full functions of GspC and GspM require the self-interaction of their respective TMSs [33,34]. Therefore, the relevance of the TMSs in the assembly and function of the IM platform needs to be reconsidered.

Recent structural studies have shed new light on the assembly of the IM platform. Notably, they have revealed that the periplasmic domains of GspL and GspM adopt a similar ferredoxin-like (FL) fold [29,32]. These studies have also highlighted the common evolutionary origin of the T2SS and the type IV pili (T4P) and have shown that all the IM core components of the T2SS have a structural ortholog within the T4P. More precisely, the GspC/L/M components adopt folds which are similar to those of PilP/M/N/O, where PilM and PilN correspond to the cytoplasmic and periplasmic regions of GspL, respectively [29,35–39]. Although the periplasmic regions of GspL and GspM, as well as PilN and PilO, adopt a similar FL fold, the organization of the subunits in the corresponding crystallographic dimers appears to be completely different [29,32,36]. This suggests that there are some essential differences in the assembly and function of these components within the respective systems. Alternatively, the biological relevance of the assumed inter-domain interfaces may be in question and needs to be examined further.

Here, using pull-down and two-hybrid assays we performed a systematic mapping of the GspC/GspL/GspM interaction regions of the T2SS in the plant pathogenic bacteria *D. dadantii*, respectively OutC/OutL/OutM. We found that the

transmembrane segments of these components interact with one another, implying a complex interactive network within the IM. Two-hybrid assays showed that homo- and heterodimerizations of the FL domains (FLD) of OutL and OutM are rather exclusive, implying an overlap of the respective interaction sites. At the same time, disulfide bonding analyses indicated that the FLD/FLD interfaces formed by OutL and OutM include the equivalent secondary-structure elements, suggesting alternating FLD interactions, L/L and M/M versus L/M. Disulfide-bonding analysis, applied to the transmembrane segment of OutM, indicates that these displacements of the FL domains induce coordinated movements or rotations of the cognate TMSs.

Results

Interactions between the full-length OutC, OutL and OutM

First, a GST pull-down assay was used to search for potential bi-partner interactions between OutC, OutL and OutM. The full-length proteins, carrying a GST-tag, were bound onto Glutathione Sepharose and used as baits, whereas those carrying a His-tag were solubilized with Triton X-100 and used as prey in the liquid phase. These assays revealed that each of the three proteins interacts *in vitro* with itself and with the two other proteins (Figure 1A–C, compare lanes 1 and 2).

Next, the bacterial two-hybrid system [40] was employed to investigate potential interactions between OutC, OutL and OutM *in vivo*. This technique was initially developed to assess the interactions between soluble proteins in the *E. coli* cytoplasm but it is also compatible with bitopic IM proteins [33,41,42]. In the last case, the T18 or T25 domain of adenylate cyclase, CyaA, is fused to the N-terminus of a full-length membrane protein and, consequently it remains in the cytoplasm (Figure 2A, top left panel). As a result, protein-protein interactions that occur in the IM and/or in the periplasm direct the reconstitution of CyaA activity in the cytoplasm and, hence, the expression of the reporter genes (*via* cAMP synthesis). Here, fusions of T18 or T25 to the full-length OutC and OutM were employed. Since the fusions with the full-length OutL were not stable (data not shown), OutL Δ cyt, lacking the cytoplasmic region, was used instead (Figure S1A). The tested protein combinations, except for OutM/OutM pair, produced significant levels of β -galactosidase, indicating that the three proteins interact with each other; in addition, OutC and OutL Δ cyt self-interact (Figure 2B). With the exception of the OutM/OutM pair, these data are fully consistent with the results of the pull-down assays and they indicate that the periplasmic regions and/or the TMSs of OutC, OutL and OutM may interact.

Dissection of the periplasmic interactions

To test this hypothesis, the periplasmic regions of the three proteins (Figure S1A) were probed in a pull-down assay. OutM and OutL interacted with both GST-OutMp and GST-OutLp, whereas OutC did not (Figure 1A and B, compare lanes 1 and 3). In addition, no protein was bound to GST-OutCp (Figure 1C, lane 3), indicating that the periplasmic region of OutC does not interact with itself or with that of OutM and OutL. The two-

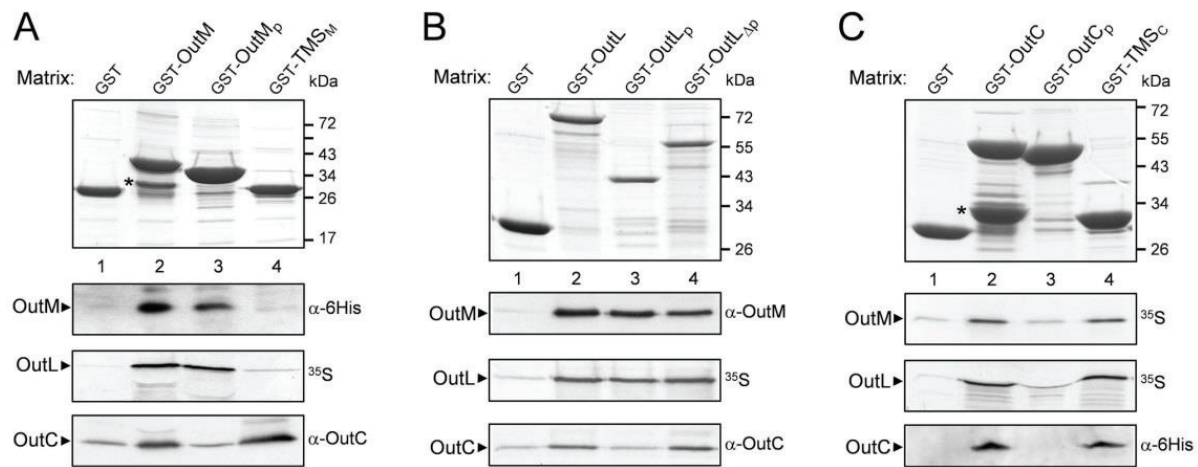


Figure 1. Dissection of the interacting regions of OutC, OutL and OutM in pull-down assays. The GST-fused derivatives of OutM (A), OutL (B) or OutC (C) (indicated at the top) were immobilized on Glutathione Sepharose beads, to constitute the affinity matrices (upper panels). Next, the indicated proteins of interest were incubated with these matrices for 1 h and unbound proteins were washed away. Bound proteins were eluted with Laemmli sample buffer, separated by SDS-PAGE and either stained (upper panels), or (lower panels) probed with the indicated antibodies, or revealed by autoradiography (^{35}S). GST-fused degradation products are indicated by asterisks. Schematic representation of the used derivatives is shown in Figure S1.

doi: 10.1371/journal.pone.0079562.g001

hybrid assays showed similar results: the levels of β -galactosidase indicated a strong interaction between OutLp and OutMp and a rather weak homo-dimerization for each of them (Figure 2C). No interaction involving the periplasmic region of OutC was detected.

Structural studies have revealed that the C-terminal regions of EpsL from *V. parahaemolyticus* and EpsM from *V. cholerae* (23 % and 28 % of identity with the equivalent regions of OutL and OutM, respectively) adopt a similar ferredoxin-like (FL) fold (Figure 3) [29,32]. When the FL domains of OutL and OutM, denoted L_{FLD} and M_{FLD} respectively, were assessed in a two-hybrid assay, the levels of β -galactosidase were even higher than those observed with the entire periplasmic regions (Figure 2C, compare Lp/Mp with L_{FLD} /Mp and Mp/Lp with M_{FLD} / L_{FLD}). This indicates that the FL domains drive the dimerization of the respective periplasmic regions. Consistent with this, OutM₉₈₋₁₆₂ ($M_{\Delta\text{FLD}}$), lacking a short N-terminal section of the FLD, did not interact with OutL_{FLD} and OutM_{FLD} (Figure 2C), indicating that integrity of the domain is essential for these interactions.

Pull-down assays suggest multiple interactions between the TMSs of OutC, OutL and OutM

The present data from the two-hybrid and pull-down assays do not explain how the full-length OutC interacts with OutL and OutM. It cannot be excluded that removal of the N-terminal part of OutC affects the remaining periplasmic region and, consequently, prevents its interactions. Alternatively, the TMSs of these proteins may interact. To investigate this possibility, the TMSs of OutC and OutM (TMS_C and TMS_M , respectively) were probed in a GST pull-down assay (Figures 1 and S1A). Since GST- TMS_L was not stable (data not shown), GST-

OutL Δ p, carrying the TMS together with the cytoplasmic region, was used as an alternative. These assays showed that the full-length OutL, OutM and OutC bind to GST- TMS_C (Figure 1C, lane 4). Reciprocally, the full-length OutC bind to GST- TMS_M and to GST-OutL Δ p (Figure 1A and B, lane 4). These data indicate that the TMS of OutC interacts with itself and with the TMSs of OutL and OutM. On the other hand, an interaction between the TMS of OutL and OutM remains uncertain. Indeed, neither OutL nor OutM bind to GST- TMS_M (Figure 1A, lane 4), suggesting that the TMS of OutM does not interact with itself or with the TMS of OutL. However, tested in the other direction, OutM does bind to OutL Δ p (Figure 1B, lane 4), suggesting an interaction between TMS_L and TMS_M .

Adaptation of the two-hybrid assay for TMS-TMS interactions

To investigate further these putative TMS-TMS interactions *in vivo*, we adapted the two-hybrid assay. The N-terminus of the TMS of interest was fused to either T18 or T25 domain of CyaA, while the C-terminus of TMS was fused to β -lactamase (Figure 2A, top right panel). Since BlaM is a monomeric protein of a size comparable with that of the periplasmic regions of OutC, OutM and OutL, its fusion to a TMS would be compatible with the studied TMS-TMS interactions. Moreover, β -lactamase allows to check the correct topology of the TMS in the inner membrane. A correct (N-in/C-out) insertion of the triple fusion directs the BlaM moiety into the periplasm and, hence, provides resistance to ampicillin. For this reason, the *blaM* gene of the pUT18C vector was replaced by *cat* (Cm^R). All the generated triple fusions (T25-TMS-BlaM) were found to be ampicillin-resistant (up to 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) and trypsin-sensitive in a

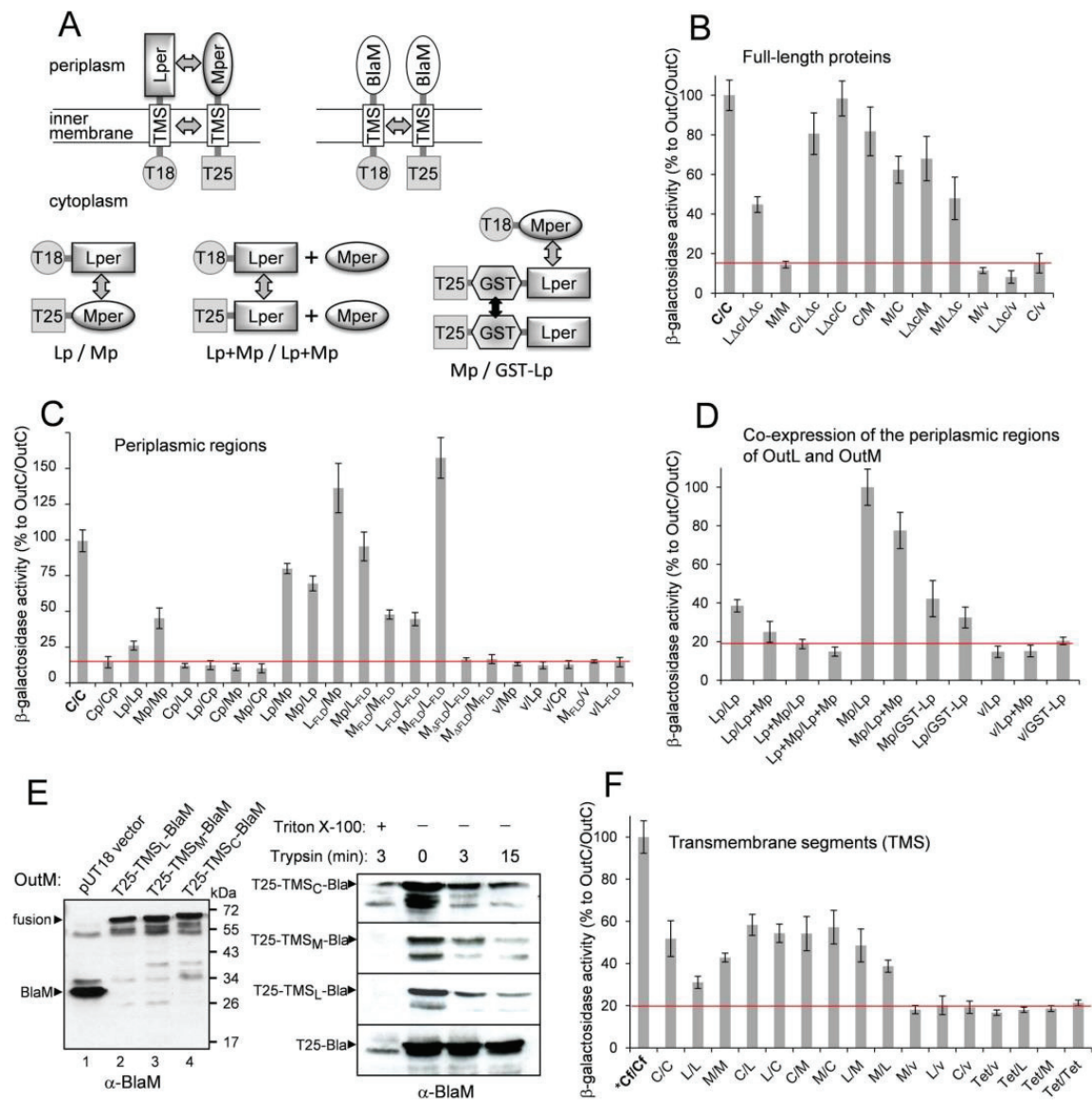


Figure 2. Bacterial two-hybrid assays map the interacting regions of OutC, OutL and OutM. (A), the fusions of T18(T25) to either the full-length proteins (top left), or the transmembrane segments (top right), or the periplasmic regions (bottom) were generated and used in two-hybrid assays as shown here. The fusions of the full-length proteins (B), the periplasmic regions (C and D) or the transmembrane segments (F) of OutC, OutL and OutM were co-expressed in *E. coli* DHP1 *cyaA* strain. The values of β -galactosidase observed with each pair (T18-fusion/T25-fusion) are expressed as percentage of that with the full-length OutC/OutC, considered as 100% and indicated as C/C (B and C) or *Cf/Cf (F). In (F), the triple T18(T25)-TMS-BlaM fusions are denoted as C, L and M, for an easy reading. All assays were performed from triplicate culture on three to four different transformants, standard deviations are indicated. (E), to check the integrity of the triple T25-TMS-BlaM fusions, *E. coli* cells expressing these fusions (indicated at the top) were probed by immunoblotting with BlaM-antibodies (left panel). To assess the correct insertion of these fusions into the inner membrane, as shown in (A), *E. coli* cells expressing the fusions were converted into spheroplasts and treated with trypsin for the indicated time periods (right panel). In contrast to the T25-BlaM fusion that remained in the cytoplasm, the triple T25-TMS-BlaM fusions were exposed in the periplasm since they were degraded by trypsin.

doi: 10.1371/journal.pone.0079562.g002

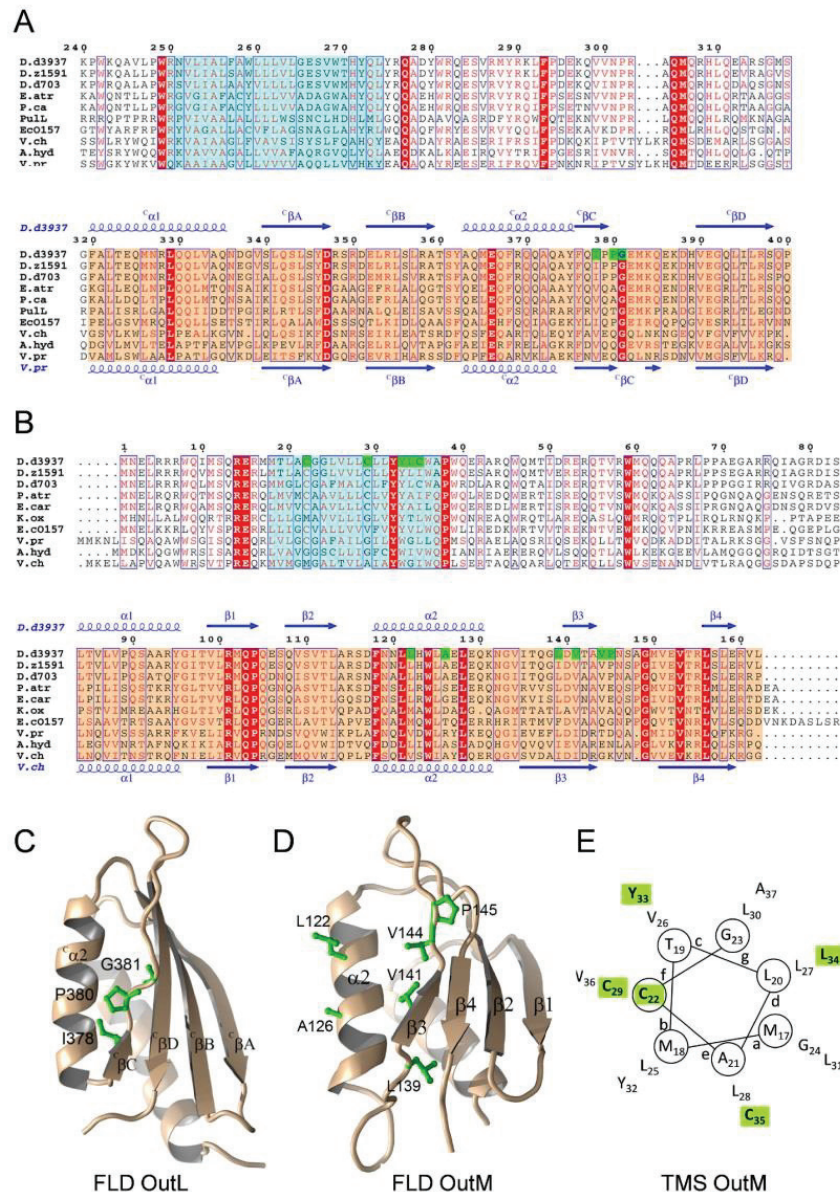


Figure 3. Overview of the positions in OutL and OutM selected for mutagenesis. (A and B), multiple sequence alignments of representative examples of OutL (A) and OutM (B) homologues (UniProt/NCBI accession codes are listed in Supplemental section). The residue numbering is for *D. dadantii* 3937 OutL and OutM, respectively. The secondary structure elements corresponding to the crystal structures of the periplasmic domain of EpsL from *V. parahaemolyticus* (PDB entry 2W7V) and of EpsM from *V. cholerae* (PDB entry 1UV7) are indicated at the bottom and those of the modeled OutL and OutM at the top, respectively. The equivalent secondary elements of OutL and OutM possess different denominations, according to the original reports [29,32]. Residues in red or in red background are similar and identical, respectively. The positions of the TM segment (determined with TMHMM Server v2.0 [59]) and the FL domain are indicated in cyan and orange backgrounds, respectively. The residues mutated in this study are highlighted in green. Alignment was generated using the ENDscript/ESPrnt web server [60,61]. (C and D), the models of OutL (residues 311 to 400) and OutM (residues 83 to 162) were generated with the homology molecular modeling program MODELLER 9v11 [57] by using as templates the structure of the periplasmic domain of EpsL from *V. parahaemolyticus* and of EpsM from *V. cholerae*. The residues mutated in this study are represented as green sticks. Figure was produced using PyMOL [62]. (E), the helical wheel projection of the predicted TM α -helix of OutM. The residues mutated in this study are highlighted in green.

doi: 10.1371/journal.pone.0079562.g003

spheroplast assay (Figure 2E) demonstrating the periplasmic location of BlaM. Conversely, a T25-BlaM fusion, lacking any TMS, was ampicillin-sensitive and trypsin-resistant.

The pairwise combinations of TMS_C, TMS_L and TMS_M generated variable, although noticeable, levels of β -galactosidase indicating multiple bipartner interactions between these TMSs (Figure 2F). Consistent with the pull-down data, the two-hybrid assays showed that TMS_C interacts with itself and also with TMS_L and TMS_M. In addition, the TMS_L-TMS_M interaction, ambiguous in the pull-down assay, was clearly detected in the two-hybrid assay (Figure 2F). Moreover, two-hybrid analysis revealed a TMS_M-TMS_M interaction, which was not seen in the pull-down results.

The latter discrepancy suggests that certain conditions (e.g. the detergent used in the pull-down assay) could impair some interactions. Alternatively, the two-hybrid assay may provoke some false interactions. To test this, an "inert" TMS, the first TMS of the tetracycline resistance protein TetA, was probed as a control and fused between T18 and BlaM. When the TetA fusion was combined with a fusion carrying either TMS_L or TMS_M, only a basal level of β -galactosidase was observed indicating an absence of any false positive interactions (Figure 2F).

Competition between homo- and heterodimerization of the periplasmic regions of OutL and OutM

The above data demonstrate multiple binary interactions between OutL, OutM and OutC, implicating their TMSs and periplasmic domains. Notably, the periplasmic domains of OutL and OutM are capable of both homo- and heterodimerizations. To test whether these interactions are synergistic or competing, we examined the effect of OutMp on the OutLp/OutLp interaction. Precisely, the isolated OutMp derivative was co-expressed with the T18-OutLp fusion from the same pUT18C vector (Figure 2A, bottom middle panel). A similar protein combination, T25-Lp + Mp, was generated on a pKT25 plasmid. Co-expression of OutMp with the T18-OutLp/T25-OutLp pair, decreased the β -galactosidase level (Figure 2D, compare the four left columns) suggesting that OutMp impairs the homodimerization of OutLp. To investigate, whether reciprocally, the homodimerization of OutLp affects its interaction with OutMp, we took advantage of the intrinsic dimerization of Glutathione S-transferase. To force homodimerization of OutLp, GST was fused between T25 and OutLp resulting in the T25-GST-OutLp triple fusion (Figure 2A bottom right panel). The insertion of GST did not affect the homodimerization of OutLp (Figure 2D, compare Lp/Lp with Lp/GST-Lp) but it decreased the interaction between OutLp and OutMp (Figure 2D, compare Mp/Lp with Mp/GST-Lp). Even if, it cannot be excluded that GST itself can impede the Lp/Mp interaction, the latter data suggest that an artificial dimerization of OutLp impairs its interaction with OutMp. Together, the coexpression experiments (Figure 2D) suggest that the homo- and heterodimerizations of the periplasmic domains of OutL and OutM are competing and this can imply an overlap of the respective interaction sites. To address further this question, we performed *in vivo* disulfide-bonding analysis.

Cysteine mutagenesis of the FL domain of OutM

The latter hypothesis is consistent with the structural analysis suggesting that the PilO/PilO and PilN/PilO dimers (the T4P orthologs of OutM/OutM and OutLp/OutM, respectively) may have a similar overall organization with the equivalent secondary structure elements in the interface [36]. To investigate this hypothesis, we first probed the presumed OutM_{FLD} dimer interface using cysteine mutagenesis and a disulfide-bonding analysis. To estimate the proximity of considered positions, we assessed the spontaneous formation of disulfide bonds during growth of the culture. The oxidative environment in the periplasm allows for the formation of disulfide bonds to an extent that correlates with the distance and correct orientation of the cysteine side chains [43].

The structural study of EpsM, OutM homolog from *V. cholerae* has indicated that the FLD dimer interface involves mainly residues of the α 2 helix [29]. A somewhat different FLD interface, including both the α 2 helix and β 3 strand, has been suggested for PilO [36]. Consequently, selected OutM residues located at or close to the presumed FLD interface, namely L122 and A126 (α 2 helix) together with L139 and V141 (β 3 strand) and two contiguous residues V144 and P145, were substituted with cysteine (Figure 3B and D). All the single variants fully restored pectinase secretion in the *D. dadantii* outM strain (Figure 4A). Non-reducing gel showed that the variants L122C, A126C and V141C remained monomeric while L139C, V144C and, particularly, P145C generated significant quantities of homodimers (Figure 4C, upper panel, lanes 4, 5 and 15). This indicates that the latter residues in adjacent OutM protomers are proximal and, thus, the OutM_{FLD} interface includes the β 3 strand. To examine further the possible α 2- α 2 and α 2- β 3 contacts suggested by the crystal structures of EpsM and PilO dimers, the substitutions in α 2 and β 3 were combined pairwise. The double variants, with the exception of L122C/A126C and A126C/P145C, were less abundant (Figure 4C, lower panel) but pectinase secretion was only severely impaired with L122C/L139C (Figure 4A, lane 6). Unexpectedly, none of the double variants generated a detectable quantity of homodimers (Figure 4C upper panel, lanes 6-9, 12 and 13). Moreover, L139C and P145C substitutions no longer generated dimers when a second substitution was introduced in the α 2 helix (L122C or A126C). This suggests that substitutions in the α 2 helix alter the arrangement of the β 3 strands in the dimer interface. Supporting this idea, a combination of certain substitutions in α 2 and β 3 specifically interfered with the protein function. Indeed, the OutM^{L122C/L139C} variant was secretion-deficient, even though it was produced at a similar level as the functional variants OutM^{L122C/V141C} and OutM^{A126C/L139C}. Since the combination of even three "permissive" cysteine substitutions, namely L122C/A126C/V141C, did not impair secretion, multiple cysteine substitutions *per se* are compatible with the protein function (Figure 4A and C, lane 14). Together, these data show that the OutM_{FLD} interface includes the residues of the β 3 strand and the adjacent stretch (L139, V144 and P145) while the residues of the α 2 helix (L122 and A126) are probably not directly involved in the interface but are important for the proper arrangement of the β 3 strand.

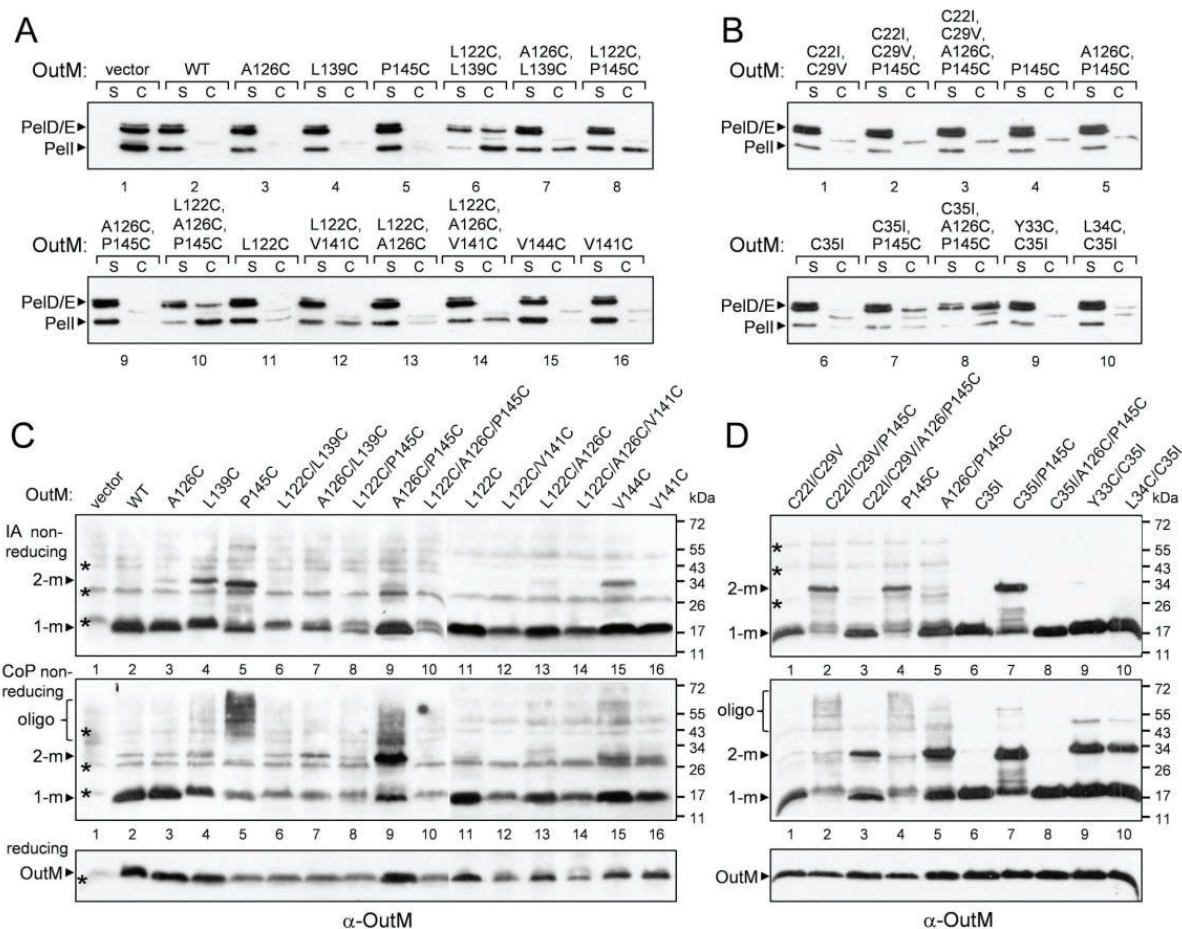


Figure 4. Functionality and disulfide-bonding patterns of cysteine variants of OutM. (A and B), secretion activity of OutM variants. *D. dadantii* A5269 *outM* cells, carrying a pTdB-oM plasmid with mutant *outM* alleles (indicated on top), were grown aerobically to steady-state and then the culture supernatant (s) and cells (c) were separated and analyzed by immunoblotting with PelD and Pell-antibodies. The quantity of secreted proteins present in the culture supernatant reflects the efficiency of secretion. (C and D), disulfide-bonding analysis of OutM variants. Cells from the same cultures as in (A) and (B) were either directly treated with iodoacetamide, to block any remaining free thiol groups (upper panels) or were firstly incubated with the oxidation catalyst CoPh, before the iodoacetamide treatment (middle panels). Then, the extent of disulfide bonding was assessed using non-reducing SDS-PAGE, followed by immunoblotting with OutM-antibodies. To estimate the quantity of each OutM variant, the same samples were analyzed in reducing conditions with 2-mercaptoethanol (lower panels). An equivalent amount of cells was loaded into each well. The positions of OutM monomers (1-m), dimers (2-m) and oligomers (oligo) are shown by arrowheads and non-specific specie interacting with OutM-antibodies are indicated by asterisks. The relative amount of homodimer formed by each variant reflects the proximity of the respective residue to the same residue of an adjacent OutM protomer.

doi: 10.1371/journal.pone.0079562.g004

Cysteine mutagenesis of the ferredoxin-like domain of OutL

Using the same approach, we examined whether the β C strand of OutL, equivalent to the β 3 strand in OutM (Figure 3), may also be involved in the FLD interfaces of OutL/L and OutL/M dimers. Consequently, the OutL variants I378C, P380C and G381C (β C) (Figure 3A and C) were co-expressed from the same plasmid with the wild-type OutM in the *D. dadantii*

$\Delta outL$ A5434 strain (when expressed alone in this background, OutL provoked significant growth defects). The three OutL variants were produced at the wild type level and generated comparable quantities of homodimers (Figure S2A). This suggests that the β C strand is involved in the OutL/L FLD interface.

OutL^{P380C} was non-functional (Figure S2B, lane 8), suggesting that the proline substitution caused significant

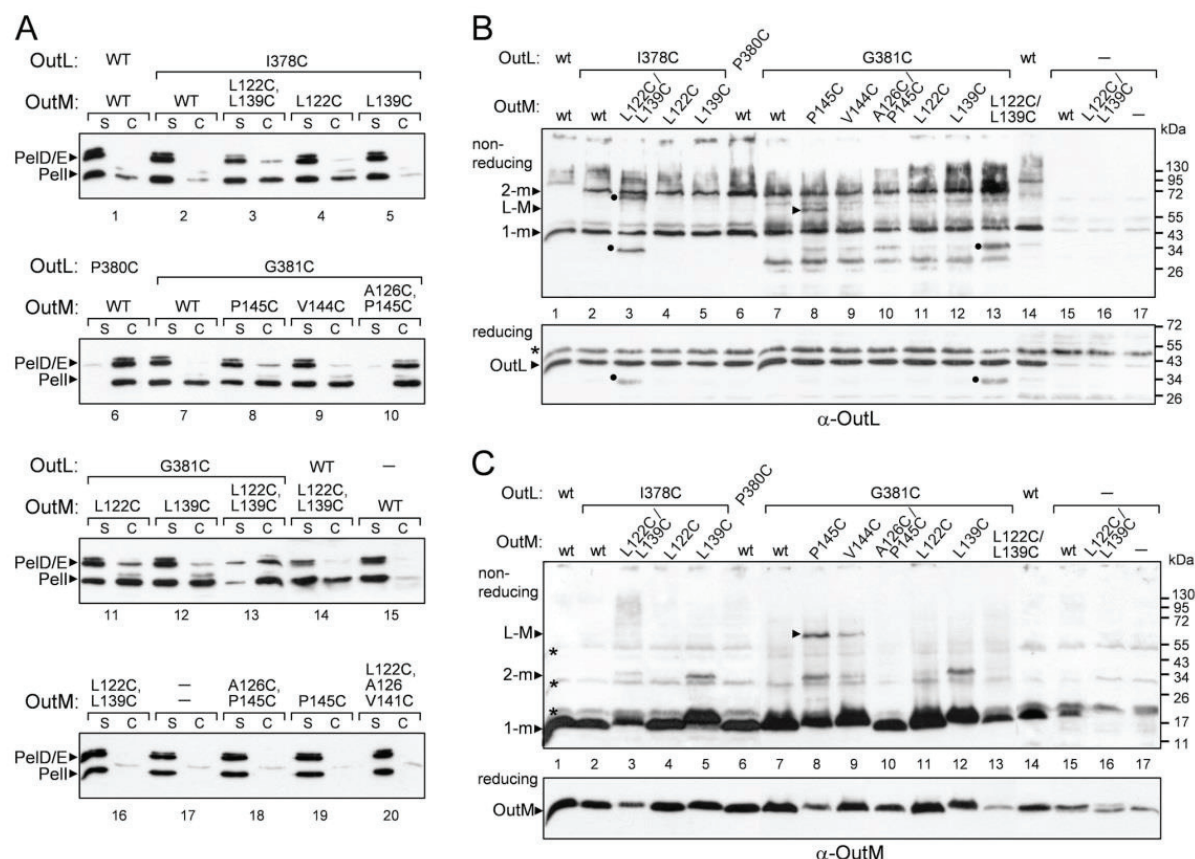


Figure 5. Functionality and disulfide-bonding patterns of the co-expressed cysteine variants of OutL and OutM. (A), secretion activity of OutL/M variants. (B and C), disulfide-bonding analysis of OutL/M variants. *D. dadantii* A4229 wt cells, carrying a pTdB-oLoM plasmid co-expressing mutant *outL* and *outM* alleles (indicated on top), were grown, treated and analyzed with either PelD and Pell antibodies (A), or with GST-OutL antibodies (B), or with OutM antibodies (C), as in Figure 4. The positions of OutL and OutM monomers (1-m), dimers (2-m) and OutL-M heterodimers (L-M) are indicated by arrowheads. Non-specific species interacting with OutM-antibodies are shown by asterisks and OutL-degradation products, by dots. The amounts of formed dimers reflect the proximity of the respective residues from adjacent protomers.

doi: 10.1371/journal.pone.0079562.g005

structural alterations. Consequently, this variant was excluded from any further analysis. To examine the presumed OutL/M interface, OutL^{I378C} and OutL^{G381C} were co-expressed in the *D. dadantii* Δ outL strain with one of the OutM variants, L122C, A126C, L139C, V144C, P145C, L122C/L139C or A126C/P145C. Most of the combinations restored pectinase secretion at, or near, the wild-type level except OutL^{G381C}/OutM^{L122C/L139C} and OutL^{G381C}/OutM^{A126C/P145C} which were more severely affected (Figure S2B, lanes 11 and 12). Surprisingly, expression of the two latter combinations in the wild-type *D. dadantii* A4229 strain also dramatically diminished pectinase secretion (Figure 5A, lanes 10 and 13). These data indicate a dominant negative interference of these variants with the secretion system. When separated in a non-reducing gel, the OutL^{G381C}/OutM^{P145C} pair generated an additional species of about 60 kDa that cross-reacted with both OutL and OutM

antibodies and this is consistent with an OutL-M complex (Figure 5B and C, lane 8). Such a complex was much less abundant with the OutL^{G381C}/OutM^{V144C} pair (Figure 5C, lane 9) indicating that contrary to OutM^{P145C}, OutM^{V144C} is not close enough to OutL^{G381C}. Remarkably, when co-expressed with OutL^{G381C}, OutM^{P145C} generated both hetero- and homodimers, indicating that β 3- β C (OutM/L) and β 3- β 3 (OutM/M) interactions occur simultaneously or alternate in the course of secretion (Figure 6A).

As was observed for the homodimerization of OutM, the α 2 helix also affects the presentation of P145C in the OutL/M interface. Actually, addition of the A126C mutation (α 2) prevented formation of the complex by OutL^{G381C}/OutM^{A126C/P145C} (Figure 5C, compare lanes 8 and 10). Similarly, a negative effect observed with OutL^{G381C}/OutM^{L122C/L139C} could probably be attributed to a mutual destabilization of these variants carrying

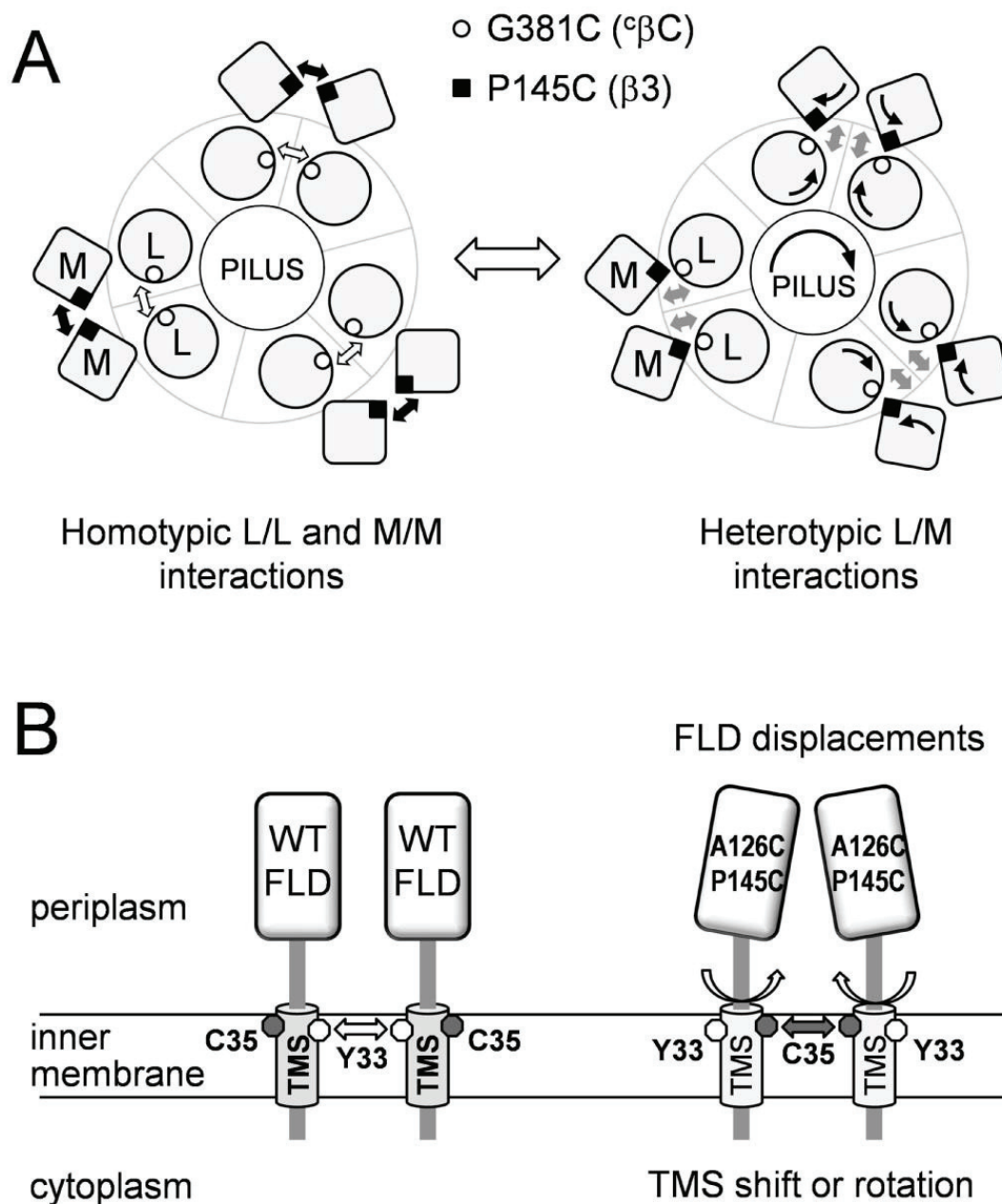


Figure 6. The FL domains and the TM segments of OutL and OutM are involved in the dynamic formation of functional homodimers and heterodimers. (A), schematic representation of the interactions between the FL domains of OutL and OutM. The view is from the periplasm inwards. The FL domains of OutL and OutM are shown as circles and squares, respectively. Left panel, adjacent FLD^{OutL} interact via $^{\circ}\beta$ C strands (G381C) while adjacent FLD^{OutM} interact via β 3 strands (P145C). Right panel, presumed interactions with an extra partner, for instance with OutG and/or OutJ/OutH pseudopilins [44,52] during pilus elongation, can switch the L/L and M/M interactions to L/M interactions. The same secondary structure elements, $^{\circ}\beta$ C (G381C) and β 3 (P145C), respectively, are involved. These displacements of the FL domains could trigger a shift or a rotation of the cognate TMS, similar to those shown in panel B. (B), in the wild-type OutM, the TMSs are arranged so that the Tyr33 residues of adjacent protomers are proximal (left panel). In OutM^{A126C/P145C}, the displacements in the FL domains induce a rearrangement or a rotation of the TMSs such that the Cys35 residues become proximal (right panel).

doi: 10.1371/journal.pone.0079562.g006

substitutions at or close to the interface. Indeed, the amount of OutM^{L122C/L139C} was significantly reduced in the presence of OutL^{G381C} and, conversely, OutL^{G381C} degradation products appeared in the presence of OutM^{L122C/L139C} (Figure 5B and C, lanes 13 and 14).

These data support the hypothesis that the α C and β 3 strands of OutL and OutM, respectively, are involved in the dynamic formation of functional homodimers and heterodimers (Figure 6A).

Displacements of the FL domain of OutM trigger a rearrangement or rotation of the cognate TMS

The TMS of OutM possesses three native cysteine residues namely Cys22, Cys29 and Cys35 (Figure 3E). None of these residues generated disulfide bonds during growth in culture since no dimer was detected with the wild-type OutM (Figure 4C, upper panel, lane 2). Treatment of *D. dadantii* cells with the oxidation catalyst copper phenanthroline, CoPh, which provokes disulfide bonding within the plasma membrane, generated only a low quantity of homodimers with OutM^{WT} (Figure 4C, middle panel, lane 2). This indicates that the cysteine residues in adjacent OutM TMSs are not close enough to each other. Most of the tested OutM variants were also only slightly affected by the CoPh treatment. In contrast, a significant amount of homodimer was generated with OutM^{A126C/P145C} (Figure 4C, middle panel, lane 9). Also, OutM^{P145C} no longer formed homodimers but instead generated high molecular mass species indicative of OutM oligomers (Figure 4C, lane 5). These data suggest that P145C and A126C/P145C substitutions in the FL domain alter the arrangement of the cognate TMSs such that certain membrane-embedded cysteines became proximal. To address this question, the native cysteine residues of the OutM TMS were substituted with Ile or Val. Neither the secretion nor the cross-linking patterns of the respective OutM^{C22I/C29V} and OutM^{C35I} mutants were affected; they remained mostly monomeric regardless of the CoPh treatment (Figure 4B and D, lanes 1 and 6). When C22I/C29V was combined with P145C and A126C/P145C substitutions, disulfide-bonding patterns of the resulting OutM^{C22I/C29V/P145C} and OutM^{C22I/C29V/A126C/P145C} were equivalent to those of OutM^{P145C} and OutM^{A126C/P145C}, respectively (Figure 4D, upper and middle panels, compare lanes 2 to 4 and 3 to 5). This clearly indicates that neither Cys22 nor Cys29 are accessible for cross-linking. In contrast, the combination of C35I with P145C and A126C/P145C drastically altered the disulfide-bonding patterns. Unlike OutM^{P145C}, the homodimer of OutM^{C35I/P145C}, which was spontaneously formed *via* P145C, was still intact under CoPh treatment (Figure 4D, compare lane 7 to 4). Furthermore, OutM^{C35I/A126C/P145C} did not generate dimers even after the CoPh treatment (Figure 4D, compare lane 8 to 5). These data show that the CoPh-induced dimers of OutM^{A126C/P145C} and OutM^{C22I/C29V/A126C/P145C} were generated *via* Cys35.

Since, in the wild-type OutM, Cys35 is not able to induce disulfide bonding, these results also indicate that P145C and A126C/P145C substitutions in the FL domain trigger a rearrangement or a rotation of the cognate TMSs, resulting in the adjacent Cys35 being close enough to form disulfide bonds

(Figure 6B, right panel). To investigate this hypothesis, we probed the native arrangement of the OutM TMSs by introducing cysteine at the place of Tyr33 or Leu34 (Figure 3E). The resulting OutM^{Y33C/C35I} and OutM^{L34C/C35I} variants were fully functional (Figure 4B, lanes 9 and 10) and, contrary to OutM^{WT}, they generated homodimers during CoPh treatment (Figure 4D, lanes 6, 9 and 10). The extent of dimerization was higher with Tyr33, indicating a closer TMS-TMS contact. Together, these data imply that, in adjacent OutM^{WT} protomers, the Tyr33 residues are proximal but the protomers of OutM^{A126C/P145C} are arranged such that the Cys35 residues become proximal (Figure 6B). Considering that Tyr33 and Cys35 are located on opposite sides of the TM helix (Figure 3E), this is consistent with a shift or rotation of the TMS in the mutant FLD^{A126C/P145C}.

Since the OutM^{A126C/P145C} variant remains functional (Figure 4B, lane 5), the observed displacements of its FLD and TMS could mimic some functionally relevant states of these domains. Indeed, once co-expressed with OutL, OutM^{WT} produced a significant amount of CoPh-induced homodimers (Figure S3). This suggests that OutL provokes a rearrangement of the OutM TMS similar to that observed in OutM^{A126C/P145C}. Supporting this idea, the introduction of the C35I substitution in the OutL/OutM pair diminished the quantity of CoPh-induced homodimer (Figure S3). This indicates that, in the presence of OutL, the TMS of OutM are arranged such that the Cys35 residues are proximal. Therefore, it seems likely that, depending on the folding state of the FL domain of OutM or on the presence of OutL, the OutM TM helix can shift or rotate resulting in TMS-TMS contact *via* either Cys35 or Tyr33.

Discussion

This study investigated the organization of the inner membrane core components OutC, OutL and OutM, within the T2SS of *D. dadantii*. These components, together with the multi-spanning protein OutF and the ATPase OutE, are thought to constitute an IM platform of uncertain function and unknown stoichiometry [16]. The periplasmic regions of OutM and OutL, together with the cytoplasmic domain of OutL, have been shown to direct multiple interactions, while the TMSs of the IM components were thought to be passive anchors. However, our previous study showed that the TMS of OutC drives the self-assembly of the protein [33]. Similarly, a ToxR based two-hybrid assay has demonstrated that the TMS of EpsM (OutM homolog from *Vibrio*) can also self-dimerize *in vivo* [34]. This finding apparently contradicts previous *in vitro* results that suggested TMS is not required for EpsM dimerization [29]. Such a discrepancy may result from the different experimental approaches used. To address this question, we combined truncation analysis with *in vitro* pull-down and *in vivo* two-hybrid assays. To specifically detect the TMS-TMS interactions in the bacterial cytoplasmic membrane, we modified the bacterial two-hybrid system [40]. The TMSs of interest were fused to the periplasmic reporter protein, BlaM, indicating a correct insertion of the TMS into the IM. This technique can be used to study any TMS-TMS interaction within the natural membrane background. Overall, the results of the two-hybrid and pull-down assays are coherent and show that the TMSs of OutC,

OutL and OutM are involved in multiple interactions. For example, the TMS of OutC interacts with itself and with the TMSs of OutL and OutM. Similarly, the TMS_L and TMS_M also interact with each other. These data suggest a complex interactive network within the IM.

Mapping of the interaction sites within the periplasmic regions clearly shows that the FL domains of OutL and OutM are the main interacting modules driving the L/L, M/M and L/M interactions. These results are generally consistent with the previous yeast two-hybrid and *in vitro* studies, which identified the interaction region within the C-terminal portions of GspL and GspM [16,28,29,32,44]. These data apparently disagree with the report on the T2SS of *Vibrio* [31], which concluded that the last 66 C-terminal residues of EpsM (almost the entire FL domain) are not required for the interaction with EpsL since the remaining N-terminal portion of EpsM still interacts with EpsL. Moreover, since deletion of the 83 N-terminal residues of EpsM did not prevent its interaction with EpsL, the authors have proposed that the L/M interaction site is located between the residues 84 to 99 (α 1-helix) of EpsM [31]. The present study provides an explanation for this discrepancy. We have demonstrated that two distant regions of OutL and OutM, namely TMS and FLD drive these protein interactions.

The multi-protein two-hybrid assays indicate that homo- and heterodimerizations of the FL domains of OutL and OutM are competing that suggests an overlap of these interaction sites. This idea concurs with the structural analysis of PilO and PilN, the T4P components, orthologous to OutM and OutLp, respectively [36]. The authors have assumed that the PilO/PilO and PilN/PilO interfaces include the structural elements of the FL domains, equivalent to the α 2 helix and the β 3 strand of OutM. The present disulfide bonding analysis supports this hypothesis. Indeed, among the combinations of substitutions introduced in the presumed OutM^{FLD} interface, only the single L139C, V144C and P145C variants, located at or close to the β 3 strand, generate a significant quantity of homodimers. These data show that the β 3 strand is directly involved in the OutM^{FLD} interface. The α 2 helix affects the arrangement of the β 3 strands in the OutM interface since the substitutions in α 2 (L122C and A126C) prevent the β 3- β 3 dimerization via L139C, V144C or P145C. Moreover, combination of certain substitutions in α 2 and β 3 (OutM^{L122C/L139C}) specifically impair the protein function, suggesting important alterations in the FLD interface and/or the overall fold. However, such presumed α 2- α 2 or α 2- β 3 complexes could not be detected in this study and, consequently a direct involvement of the α 2 helix in the OutM FLD interface remains uncertain.

The generated cysteine variants of OutL efficiently produced homodimers, indicating that the OutL/L FLD interface includes the $^{\circ}\beta$ C strand (equivalent to the β 3 strand of OutM). This may indicate a similar arrangement of the FL domains of OutL and OutM within their respective homodimers. These data apparently contradict results from the structural analysis of the periplasmic region of EpsL (OutL homolog from *V. parahaemolyticus*), which assumed that the peri-EpsL dimer interface is entirely different from that of peri-EpsM and includes dissimilar structural elements, notably $^{\circ}\beta$ A and $^{\circ}\alpha$ 1 (equivalent to β 1 and α 1 of EpsM) [32]. In such an

arrangement of peri-EpsL subunits, the $^{\circ}\beta$ C strand (carrying the residues equivalent to those substituted in OutL) is distant from the dimer interface. However, the actual release of the PDB 2W7V shows another organization of the peri-EpsL dimer with an interface including $^{\circ}\beta$ C and $^{\circ}\alpha$ 2 (equivalent to β 3 and α 2 of EpsM) which is more consistent with the results of our disulfide bonding analysis.

The present study demonstrates the dynamic nature of the FLD-FLD interactions between OutL and OutM. Indeed, OutM^{P145C} generated not only homodimers but also heterodimers with OutL^{G381C}. In turn, OutL^{G381C} was also efficiently homodimerized. These data imply a succession of homotypic β 3- β 3 (P145C-P145C) and $^{\circ}\beta$ C- $^{\circ}\beta$ C (G381C-G381C) interactions of adjacent OutM/M and OutL/L protomers, respectively, and heterotypic β 3- $^{\circ}\beta$ C (P145C-G381C) interactions between OutM and OutL (Figure 6A). These results are consistent with our previous study which showed alternating interactions between the periplasmic domains of OutC and OutD [15]. More unexpectedly, the present work suggests that the successive FLD-FLD contacts mediate rearrangements and/or rotations of the cognate TMSs. Indeed, depending on the presence of a particular mutation in the FLD^{OutM} (A126C/P145C) or an appropriate interacting partner (OutL), the TMSs of adjacent OutM subunits can move or rotate resulting in TMS-TMS contact via either Cys35 or Tyr33 (Figure 6B). This finding provides a simple mechanistic explanation of how the same face of the FLD^{OutM}, including β 3, can move from homotypic (M-M) to heterotypic (M-L) contacts. In fact, the FLD can act as a pivot and its successive movements induce certain coordinated rotations of the cognate TMS. Considering the number of other assumed TMS-TMS interactions, the inner membrane platform of the T2SS could constitute a sort of cogwheel mechanism, transmitting the signal from the periplasmic to the cytoplasmic side of the secretion machinery including the ATPase OutE or *vice versa*. Consistent with this idea, a previous study has shown that activation of the ATPase EpsE necessitates an interaction between the EpsL segment adjacent to the TMS and the membrane lipids [45]. This would lead to a coordinated movement of the cognate TMS_L and, hence, it is consistent with a dynamic arrangement of the TMSs within the IM platform of T2SS. Remarkably, a similar cysteine-scanning/bonding approach has been previously used with several other cell machineries and revealed dynamic nature of these transmembrane complexes [42,46-48].

However, an important question remains to be elucidated, that of determining what events might cause successive FLD-FLD interactions. One possibility could be an interaction with another T2SS component or with the secretion substrate. The periplasmic domain of OutL has been shown to interact with those of the pseudopilins OutJ and OutH [44], which are thought to be part of the pilus tip complex [49-51]. A recent study has also demonstrated direct contact between EpsL and the major pseudopilin EpsG, homologues to OutL and OutG, respectively [52]. Thus, we can imagine that each step of pilus elongation would, in turn, switch the interactions of the OutL FLD, L/L to L/M or inversely (Figure 6A). Our previous studies have shown that the periplasmic HR domain of OutC interacts

with several sites within the periplasmic domains of the secretin OutD [14,15]. These interactions could control the entry of the secretion substrate into the periplasmic vestibule formed by the secretin and its gating/opening. In addition, the OutL/OutM couple significantly increases the stability of OutC and alters its interactions with OutD [15], indicating direct interaction of OutL/OutM with OutC. The present study suggests that the periplasmic region of OutC does not interact with those of OutL and OutM, but that their TMSs interact. Therefore, the interactions sensed by the periplasmic domains of OutC could be transmitted, *via* the TMS, to OutL and OutM, or *vice versa*.

Clearly, further studies are needed to elucidate the exact molecular mechanisms of the TMS assembly and the details of the interactions within the IM portion of the T2SS machinery.

Materials and Methods

Strains, plasmids and growth conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Tables S1 and S2. The bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) at 28°C with shaking at 120 rpm. If necessary, antibiotics were added at the following final concentrations: ampicillin, 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; kanamycin, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and chloramphenicol, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

DNA cloning and manipulation were carried out using standard methods. Site-directed mutagenesis was performed with the QuickChange kit (Stratagene) and the primers listed in Table S3. The sequences of mutant and amplified genes were checked (Eurofins MWG Operon). Plasmids pTdB-oM and pTdB-oLoM, expressing *outM* or *outL-outM* genes were constructed by cloning the corresponding DNA fragments under the control of *PpeI/C*. To generate plasmids expressing Out derivatives fused to either GST, 6His, T18, or T25, the corresponding *out* gene fragments were amplified by PCR and subcloned into either pGEX-6P-3, pET20b(+), pUT18C or pKT25 vectors, respectively. More details are described in File S1. The *D. dadantii* ΔoutL and *outM* mutant strains were constructed as described in File S1.

Functional tests and *in vivo* disulfide cross-linking analysis

To assess the functional relevance of the generated cysteine substitutions in OutM and OutL, the mutant alleles were introduced into pTdB-oM and/or pTdB-oLoM plasmid and expressed in *D. dadantii* A5269 *outM* or A5434 ΔoutL *pecS* strain, respectively. The bacteria were grown in LB supplemented with ampicillin at 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and, if necessary, with galacturonate, 1 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, aerobically at 120 rpm and at 28°C for 14 h to steady-state. Culture supernatant and cells were separated at 10,000 g for 2 min and analyzed by immunoblotting with PeI and Pell-antibodies [33].

To assess the extent of disulfide cross-linking between the periplasmic domains, the spontaneous formation of disulfide bonds in steady-state cultures was examined. To generate formation of disulfide bonds between the TMSs within the plasma membrane, cells were incubated with the oxidation catalyst copper phenanthroline, CoPh [53]. Briefly, bacteria were grown as above and cells from 1.3 ml of culture (OD_{600} of

1.6–1.8) were spun at 10,000 g for 1 min and washed with TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl). Next, the cells were resuspended in 1 ml of TBS and divided into two aliquots. One aliquot was supplemented with CoPh to 1 mM and incubated for 10 min at 15°C. After that, the cells were washed in TBS and, in order to block the free thiol groups and prevent further disulfide bond formation, they were incubated with 10 mM iodoacetamide in TBS for an additional 30 min at 15°C. Another aliquot was immediately supplemented with 10 mM iodoacetamide in TBS and incubated for 30 min at 15°C. Then, the cells were spun, washed, resuspended in 100 μl Laemmli sample buffer without 2-mercaptoethanol and lysed in boiling water for 10 min. The samples were next supplemented with the same volume of 12 M urea (at 55°C), incubated for 20 min at 37°C and loaded onto 9 % Tris-Tricine SDS-PAGE [54] supplemented with 6 M urea. The extent of disulfide bonding was assessed by immunoblotting with OutM or GST-OutL antibodies. To estimate the abundance of the OutM and OutL variants in the cells, the same cell samples were treated with 10 mM 2-mercaptoethanol.

Bacterial two-hybrid assays

The bacterial two-hybrid system [40], kindly provided by G. Karimova, was used as described previously [33]. Combinations of various Out derivatives fused to T18 or T25 (listed in Table S1) were co-transformed into the *Escherichia coli* *cyaA* strain DHP1 [40] and the transformants were plated on MacConkey-maltose agar. The color of the colonies was monitored during an incubation at 30°C for 36–48 h. To quantify the protein interactions, DHP1 cells, carrying various plasmid combinations, were grown in LB supplemented with 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside and with appropriate antibiotics at 28°C for 18 h and then used for β -galactosidase assays, as described [33]. Cells were permeabilized by adding 50 μl toluene to 1 ml of culture and vortexing 3 times for 15 sec with 10 min intervals. Then, 20–100 μl of cell extracts were added to 880–800 μl of Z buffer [55] and incubated at 37°C for 5 min. The reaction was started by adding 100 μl of ortho-Nitrophenyl- β -galactoside (4 mg/ml) and stopped by addition of 0.5 ml of 1 M Na_2CO_3 . The reaction time, the OD_{420} of the reaction mixture and OD_{600} of the initial cultures were recorded and used to calculate the enzymatic activity. Next, the values of β -galactosidase (in Miller units [55]) observed with each tested plasmid pair were expressed as percentage of that with the full-length T18-OutC/T25-OutC, considered as 100% (positive control). All assays were performed from triplicate cultures on three to four different bacterial transformants and on several different days. Protease accessibility assay was performed as described [33].

Pull-down assays

The Out proteins fused to GST or 6His were produced in *E. coli* BL21(DE3) carrying an appropriate pGEX-6P-3 or pET20b(+) plasmid as described [13]. His-tagged derivatives were purified by nickel-affinity chromatography in the presence of 1% (v/v) Triton X-100. Alternatively, His-OutL and OutM were exclusively labeled with [^{35}S] cysteine-methionine (PerkinElmer) and directly extracted from the whole cells in the

presence of 1% (v/v) Triton X-100, as described [56]. GST pull-down assays were performed in the presence of 1% Triton X-100 at 15°C [13]. Briefly, equal amounts of various GST-Out derivatives were immobilized on Glutathione Sepharose. Then, an appropriate prey protein (His-Out derivative) was incubated for 1 h with immobilized GST-baits and unbound proteins were washed out for 5 times. The bound proteins were eluted with Laemmli sample buffer, separated by SDS-PAGE and probed by immunoblotting with antibodies raised against OutC, OutM or GST-OutL, or with Ni-NTA-conjugated with peroxidase (Qiagen). [³⁵S]-labeled proteins were revealed by autoradiography.

Molecular modeling

C-terminal regions of OutL (residues 311 to 400) and OutM (residues 83 to 162) were modeled with the homology molecular modeling program MODELLER 9v11 [57]. For OutL, the software identified the following crystal structure as template allowing a very confident modeling of the studied region: PDB entry 2W7V (periplasmic domain of EpsL from the type 2 secretion system of *V. parahaemolyticus*). For OutM, a unique structure was used as template as well (PDB entry 1UV7: periplasmic domain of EpsM from *V. cholerae*). For both modeling studies, 30 distinct models have been generated, and their geometry was assessed by a Ramachandran plot calculated with the program PROCHECK [58]. Consequently, the most satisfying model was retained. For OutL, it has 96.3% of non-proline and non-glycine residues in the most favored regions, 3.7% in additionally allowed regions and none in disallowed regions. For OutM, Ramachandran plot values were 97.2% residues in most favored regions, 2.8% in additionally allowed regions and none in disallowed regions.

Supporting Information

File S1. (PDF)

Figure S1. Schematic representation of OutC (A), OutL (B) and OutM (C) and their derivatives used in this study. The positions of various domains are indicated with grey boxes: TMS, transmembrane segment (TMHMM Server v2.0 [59]); HR, homology region domain (PDB entry 2LNV, [14]); PDZ domain (PDB entry 2I6V, [11]); N1, N2 and N3, cytoplasmic OutL domains (PDB entry 1W97, [30]); FL, ferredoxin-like domains of OutL (PDB entry 2W7V, [32]) and OutM (PDB entry 1UV7, [29]).

Figure S2. Disulfide-bonding patterns and functionality of cysteine variants of OutL and OutM co-expressed in *D. dadantii* A5434ΔoutL. (A), disulfide-bonding analysis of OutL/M variants. (B and C), secretion activity of OutL/M variants. *D. dadantii* A5434ΔoutL *pecS* cells, carrying a pTdB-oLoM plasmid co-expressing mutant outL and outM alleles (indicated on top), were grown, treated and analyzed with either GST-OutL antibodies (A), or PelD and Pell antibodies

(B), as in Figure 4. The positions of OutL monomers (1-m) and dimers (2-m) are indicated by arrowheads. Non-specific species interacting with GST-OutL antibodies are shown by asterisks. In (A), the amounts of formed dimers reflect the proximity of the respective residues from adjacent protomers. In (B), the quantity of secreted proteins present in the culture supernatant reflects the efficiency of secretion.

(PDF)

Figure S3. Co-expression of OutL with OutM provokes a rearrangement of the OutM TMS. Disulfide-bonding analysis of OutL/M variants. *D. dadantii* A4229 cells, carrying either a pTdB-oM or a pTdB-oLoM plasmid expressing indicated outL and outM variants (on top), were grown to steady state and were either directly treated with iodoacetamide (CoPh -), to block any remaining free thiol groups or were firstly incubated with the oxidation catalyst (CoPh +) before the iodoacetamide treatment. The extent of disulfide bonding was assessed using non-reducing SDS-PAGE, followed by immunoblotting with OutM-antibodies. The positions of OutM monomers (1-m) and dimers (2-m) are indicated by arrowheads. Non-specific species interacting with OutM antibodies are shown by asterisks. The amounts of dimers reflect the proximity of the respective residues from adjacent protomers.

Note that the co-expression of OutL with OutM provoked a significant increase in the quantity of OutM (compare lanes 1 and 2 to 3 and 4) and also a CoPh-induced homodimerization of OutM (compare lanes 6 to 7). The two right lanes (shaded) were overexposed to better show the absence of dimer of OutM^{WT}. The introduction of the C35I substitution in the OutL/OutM pair diminished the quantity of CoPh-induced homodimer (compare lanes 7 to 8).

(PDF)

Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

(PDF)

Table S2. Plasmids expressing cysteine variants of OutL and OutM used in this study.

(PDF)

Table S3. Primers employed in the study.

(PDF)

Acknowledgements

We are grateful to Guy Condemine, for reading the manuscript. We thank G. Karimova for the bacterial two-hybrid system.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ML FHL XR VES. Performed the experiments: ML FHL NG CP GE VES. Analyzed the data: ML FHL XR VES. Contributed reagents/materials/analysis tools: NG CP GE XR. Wrote the manuscript: VES FHL.

References

- Cianciotto NP (2005) Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* 13: 581–588. doi:10.1016/j.tim.2005.09.005. PubMed: 16216510.
- Filloux A (2004) The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta* 1694: 163–179. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.05.003. PubMed: 15546665.
- Korotkov KV, Sandkvist M, Hol WGJ (2012) The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol* 10: 336–351. PubMed: 22466878.
- Bouley J, Condemine G, Shevchik VE (2001) The PDZ domain of OutC and the N-terminal region of OutD determine the secretion specificity of the type II Out pathway of *Erwinia chrysanthemi*. *J Mol Biol* 308: 205–219. doi:10.1006/jmbi.2001.4594. PubMed: 11327762.
- Chami M, Guilvout I, Gregorini M, Remigy HW, Muller SA et al. (2005) Structural insights into the secretin PulD and its trypsin resistant core. *J Biol Chem* 280: 2703–2708.
- Reichow SL, Korotkov KV, Hol WGJ, Gonen T (2010) Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1226–1233. doi:10.1038/nsmb.1910. PubMed: 20852644.
- Reichow SL, Korotkov KV, Gonen M, Sun J, Delarosa JR et al. (2011) The binding of cholera toxin to the periplasmic vestibule of the type II secretion channel. *Channels* 5: 215–218. doi:10.4161/chan.5.3.15268. PubMed: 21406971.
- Gu S, Rehman S, Wang X, Shevchik VE, Pickersgill RW (2012) Structural and functional insights into the pilotin-secretin complex of the type II secretion system. *PLOS Pathog* 8: e1002531. PubMed: 22346756.
- Tosi T, Nickerson NN, Mollica L, Jensen MR, Blackledge M et al. (2011) Pilotin-secretin recognition in the type II secretion system of *Klebsiella oxytoca*. *Mol Microbiol* 82: 1422–1432. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07896.x. PubMed: 22098633.
- Dunstan RA, Heinz E, Wijeyewickrema LC, Pike RN, Purcell AW et al. (2013) Assembly of the Type II secretion system such as found in *Vibrio cholerae* depends on the novel pilotin AspS. *PLOS Pathog* 9: e1003117. PubMed: 23326233.
- Korotkov KV, Krumm B, Bagdasarian M, Hol WGJ (2006) Structural and functional studies of EpsC, a crucial component of the type 2 secretion system from *Vibrio cholerae*. *J Mol Biol* 363: 311–321. doi:10.1016/j.jmb.2006.08.037. PubMed: 16978643.
- Korotkov KV, Johnson TL, Jobling MG, Pruneda J, Pardon E et al. (2011) Structural and Functional Studies on the Interaction of GspC and GspD in the Type II Secretion System. *PLOS Pathog* 7: e1002228. PubMed: 21931548.
- Lugin FH, Fries M, Wang XH, Pickersgill RW, Shevchik VE (2010) A 20-residue peptide of the inner membrane protein OutC mediates interaction with two distinct sites of the outer membrane secretin OutD and is essential for the functional type II secretion system in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol* 76: 944–955. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07149.x. PubMed: 20444086.
- Gu S, Kelly G, Wang X, Frenkiel T, Shevchik VE et al. (2012) Solution structure of homology region (HR) domain of type II secretion system. *J Biol Chem* 287: 9072–9080. doi:10.1074/jbc.M111.300624. PubMed: 22253442.
- Wang X, Pineau C, Gu S, Guschinskaya N, Pickersgill RW et al. (2012) Cysteine scanning mutagenesis and disulfide mapping analysis of arrangement of GspC and GspD protomers within the T2SS. *J Biol Chem* 287: 19082–19093. doi:10.1074/jbc.M112.346338. PubMed: 22523076.
- Py B, Loiseau L, Barras F (2001) An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. *EMBO Rep* 2: 244–248. doi:10.1093/embo-reports/kve042. PubMed: 11266368.
- Abendroth J, Murphy P, Sandkvist M, Bagdasarian M, Hol WGJ (2005) The X-ray structure of the type II secretion system complex formed by the N-terminal domain of EpsE and the cytoplasmic domain of EpsL of *Vibrio cholerae*. *J Mol Biol* 348: 845–855. doi:10.1016/j.jmb.2005.02.061. PubMed: 15843017.
- Arts J, de Groot A, Ball G, Durand E, El Khattabi M et al. (2007) Interaction domains in the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretory apparatus component XcpS (GspF). *Microbiology* 153: 1582–1592. doi:10.1099/mic.0.2006/002840-0. PubMed: 17464073.
- Campos M, Cisneros DA, Nivaskumar M, Francetic O (2013) The type II secretion system - A dynamic fiber assembly nanomachine. *Res Microbiol* 164: 545–555. doi:10.1016/j.resmic.2013.03.013. PubMed: 23542426.
- Shevchik VE, Robert-Baudouy J, Condemine G (1997) Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of the general secretory pathway, and secreted proteins. *EMBO J* 16: 3007–3016. doi:10.1093/emboj/16.11.3007. PubMed: 9214618.
- Douzi B, Ball G, Cambillau C, Tegoni M, Voulhoux R (2011) Deciphering the Xcp *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion machinery through multiple interactions with substrates. *J Biol Chem* 286: 40792–40801. doi:10.1074/jbc.M111.294843. PubMed: 21949187.
- Michel G, Bleves S, Ball G, Lazdunski A, Filloux A (1998) Mutual stabilization of the XcpZ and XcpY components of the secretory apparatus in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 144: 3379–3386. doi:10.1099/00221287-144-12-3379. PubMed: 9884230.
- Py B, Loiseau L, Barras F (1999) Assembly of the type II secretion machinery of *Erwinia chrysanthemi*: direct interaction and associated conformational change between OutE, the putative ATP-binding component and the membrane protein OutL. *J Mol Biol* 289: 659–670. doi:10.1006/jmbi.1999.2803. PubMed: 10356336.
- Sandkvist M, Hough LP, Bagdasarian MM, Bagdasarian M (1999) Direct interaction of the EpsL and EpsM proteins of the general secretion apparatus in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 181: 3129–3135. PubMed: 10322014.
- Possot OM, Vignon G, Bomchil N, Ebel F, Pugsley AP (2000) Multiple interactions between pullulanase secretion components involved in stabilization and cytoplasmic membrane association of PulE. *J Bacteriol* 182: 2142–2152. doi:10.1128/JB.182.8.2142-2152.2000. PubMed: 10735856.
- Tsai RT, Leu WM, Chen LY, Hu N (2002) A reversibly dissociable ternary complex formed by XpsL, XpsM and XpsN of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus. *J Biochem* 367: 865–871. doi:10.1042/BJ20020909.
- Sandkvist M, Keith JM, Bagdasarian M, Howard SP (2000) Two regions of EpsL involved in species-specific protein-protein interactions with EpsE and EpsM of the general secretion pathway in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 182: 742–748. doi:10.1128/JB.182.3.742-748.2000. PubMed: 10633109.
- Robert V, Hayes F, Lazdunski A, Michel GP (2002) Identification of XcpZ domains required for assembly of the secretin of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184: 1779–1782. doi:10.1128/JB.184.6.1779-1782.2002. PubMed: 11872731.
- Abendroth J, Rice AE, McLuskey K, Bagdasarian M, Hol WGJ (2004) The crystal structure of the periplasmic domain of the type II secretion system protein EpsM from *Vibrio cholerae*: the simplest version of the ferredoxin fold. *J Mol Biol* 338: 585–596. doi:10.1016/j.jmb.2004.01.064. PubMed: 15081815.
- Abendroth J, Bagdasarian M, Sandkvist M, Hol WGJ (2004) The structure of the cytoplasmic domain of EpsL, an inner membrane component of the type II secretion system of *Vibrio cholerae*: an unusual member of the actin-like ATPase superfamily. *J Mol Biol* 344: 619–633. doi:10.1016/j.jmb.2004.09.062. PubMed: 15533433.
- Johnson TL, Scott ME, Sandkvist M (2007) Mapping critical interactive sites within the periplasmic domain of the *Vibrio cholerae* type II secretion protein EpsM. *J Bacteriol* 189: 9082–9089. doi:10.1128/JB.01256-07. PubMed: 17921296.
- Abendroth J, Kreger AC, Hol WGJ (2009) The dimer formed by the periplasmic domain of EpsL from the type 2 secretion system of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Struct Biol* 168: 313–322. doi:10.1016/j.jsb.2009.07.022. PubMed: 19646531.
- Lugin FH, Shevchik VE (2006) The single transmembrane segment drives self-assembly of OutC and the formation of a functional Type II secretion system in *Erwinia chrysanthemi*. *J Biol Chem* 281: 33152–33162. doi:10.1074/jbc.M606245200. PubMed: 16956883.
- Sal-Man N, Gerber D, Bloch I, Shai Y (2007) Specificity in transmembrane helix-helix interactions mediated by aromatic residues. *J Biol Chem* 282: 19753–19761. doi:10.1074/jbc.M610368200. PubMed: 17488729.
- Ayers M, Sampaleanu LM, Tammam S, Koo J, Harvey H et al. (2009) PilM/N/O/P proteins form an inner membrane complex that affects the stability of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin. *J Mol Biol* 394: 128–142. doi:10.1016/j.jmb.2009.09.034. PubMed: 19857645.
- Sampaleanu LM, Bonanno JB, Ayers M, Koo J, Tammam S et al. (2009) Periplasmic domains of *Pseudomonas aeruginosa* PilN and PilO form a stable heterodimeric complex. *J Mol Biol* 394: 143–159. doi:10.1016/j.jmb.2009.09.037. PubMed: 19857646.
- Karupiah V, Derrick JP (2011) Structure of the PilM-PilN inner membrane type IV pilus biogenesis complex from *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem* 286: 24434–24442. doi:10.1074/jbc.M111.243535. PubMed: 21596754.
- Tammam S, Sampaleanu LM, Koo J, Sundaram P, Ayers M et al. (2011) Characterization of the PilNPilO and PilP type IVa pilus

- subcomplex. *Mol Microbiol* 82: 1496–1514. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07903.x. PubMed: 22053789.
39. Tammam S, Sampaleanu LM, Koo J, Manoharan K, Daubaras M et al. (2013) PilMNOPQ from the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus system form a transenvelope protein interaction network that interacts with PilA. *J Bacteriol* 195: 2126–2135. doi:10.1128/JB.00032-13. PubMed: 23457250.
 40. Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5752–5756. doi:10.1073/pnas.95.10.5752. PubMed: 9576956.
 41. Karimova G, Dautin N, Ladant D (2005) Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol* 187: 2233–2243. doi:10.1128/JB.187.7.2233-2243.2005. PubMed: 15774864.
 42. Georgiadou M, Castagnini M, Karimova G, Ladant D, Pelicic V (2012) Large-scale study of the interactions between proteins involved in type IV pilus biology in *Neisseria meningitidis*: characterization of a subcomplex involved in pilus assembly. *Mol Microbiol* 84: 857–873. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08062.x. PubMed: 22486968.
 43. Lai WC, Hazelbauer GL (2007) Analyzing transmembrane chemoreceptors using in vivo disulfide formation between introduced cysteines. *Methods Enzymol* 423: 299–316. doi:10.1016/S0076-6879(07)23013-7. PubMed: 17609137.
 44. Douet V, Loiseau L, Barras F, Py B (2004) Systematic analysis, by the yeast two-hybrid, of protein interaction between components of the type II secretory machinery of *Erwinia chrysanthemi*. *Res Microbiol* 155: 71–75. doi:10.1016/j.resmic.2003.10.001. PubMed: 14990257.
 45. Camberg JL, Johnson TL, Patrick M, Abendroth J, Hol WGJ et al. (2007) Synergistic stimulation of EpsE ATP hydrolysis by EpsL and acidic phospholipids. *EMBO J* 26: 19–27. doi:10.1038/sj.emboj.7601481. PubMed: 17159897.
 46. Lee GF, Dutton DP, Hazelbauer GL (1995) Identification of functionally important helical faces in transmembrane segments by scanning mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5416–5420. doi:10.1073/pnas.92.12.5416. PubMed: 7777522.
 47. Seeger MA, von Ballmoos C, Eicher T, Brandstätter L, Verrey F et al. (2008) Engineered disulfide bonds support the functional rotation mechanism of multidrug efflux pump AcrB. *Nat Struct Mol Biol* 15: 199–205. doi:10.1038/nsmb.1379. PubMed: 18223659.
 48. Zhang XY, Goemaere EL, Seddiki N, Célia H, Gavioli M et al. (2011) Mapping the interactions between *Escherichia coli* TolQ transmembrane segments. *J Biol Chem* 286: 11756–11764. doi:10.1074/jbc.M110.192773. PubMed: 21285349.
 49. Korotkov KV, Hol WGJ (2008) Structure of the GspK–GspL–GspJ complex from the enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system. *Nat Struct Mol Biol* 15: 462–468. doi:10.1038/nsmb.1426. PubMed: 18438417.
 50. Douzi B, Durand E, Bernard C, Alphonse S, Cambillau C et al. (2009) The XcpV/GspL pseudopilin has a central role in the assembly of a quaternary complex within the T2SS pseudopilus. *J Biol Chem* 284: 34580–34589. doi:10.1074/jbc.M109.042366. PubMed: 19828448.
 51. Cisneros DA, Bond PJ, Pugsley AP, Campos M, Francetic O (2012) Minor pseudopilin self-assembly primes type II secretion pseudopilus elongation. *EMBO J* 31: 1041–1053. PubMed: 22157749.
 52. Gray MD, Bagdasarian M, Hol WGJ, Sandkvist M (2011) *In vivo* cross-linking of EpsG to EpsL suggests a role for EpsL as an ATPase-pseudopilin coupling protein in the Type II secretion system of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 79: 786–798. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07487.x. PubMed: 21255118.
 53. Falke JJ, Koshland DE Jr (1987) Global flexibility in a sensory receptor: a site-directed cross-linking approach. *Science* 237: 1596–1600. doi:10.1126/science.2820061. PubMed: 2820061.
 54. Schagger H (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1: 16–22. doi:10.1038/nprot.2006.4. PubMed: 17406207.
 55. Miller JH (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 352–355.
 56. Shevchik VE, Condemine G (1998) Functional characterization of the *Erwinia chrysanthemi* OutS protein, an element of a type II secretion system. *Microbiology* 144: 3219–3228. doi:10.1099/00221287-144-11-3219. PubMed: 9846757.
 57. Fiser A, Sali A (2003) Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol* 374: 461–491. doi:10.1016/S0076-6879(03)74020-8. PubMed: 14696385.
 58. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 26: 283–291. doi:10.1107/S0021889892009944.
 59. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer ELL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567–580. doi:10.1006/jmbi.2000.4315. PubMed: 11152613.
 60. Gouet P, Courcelle E (2002) ENDscript: a workflow with web interface to display sequence and structure information. *Bioinformatics* 18: 767–768. doi:10.1093/bioinformatics/18.5.767. PubMed: 12050076.
 61. Gouet P, Robert X, Courcelle E (2003) ESPript/ENDscript: extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 31: 3320–3323. doi:10.1093/nar/gkg556. PubMed: 12824317.
 62. DeLano WL, Lam JW (2005) PyMOL: A communications tool for computational models. *Abstr Pap Am Chem Soc* 230: U1371–U1372.

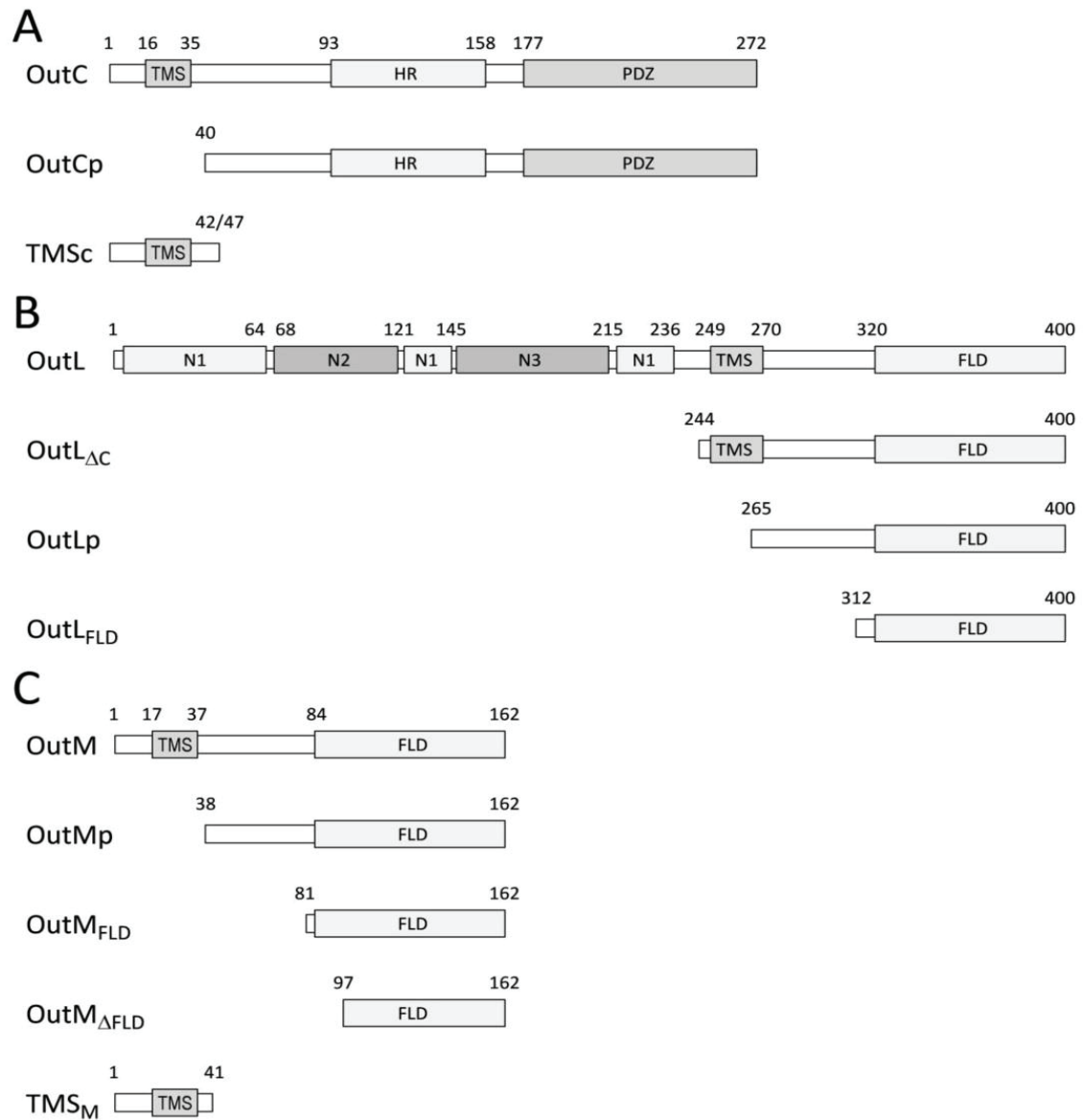


Figure S1. Schematic representation of OutC (A), OutL (B) and OutM (C) and their derivatives used in this study. The positions of various domains are indicated with grey boxes: TMS, transmembrane segment (TMHMM Server v2.0 [59]); HR, homology region domain (PDB entry 2LNV, [14]); PDZ domain (PDB entry 2I6V, [11]); N1, N2 and N3, cytoplasmic OutL domains (PDB entry 1W97, [30]); FL, ferredoxin-like domains of OutL (PDB entry 2W7V, [32]) and OutM (PDB entry 1UV7, [29]).

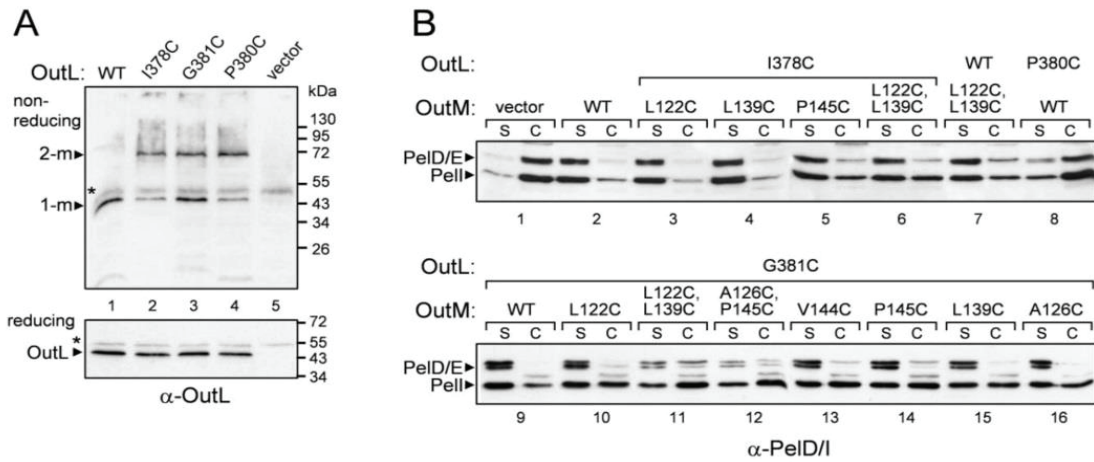


Figure S2. Disulfide-bonding patterns and functionality of cysteine variants of OutL and OutM co-expressed in *D. dadantii* A5434ΔoutL. (A), disulfide-bonding analysis of OutL/M variants. (B and C), secretion activity of OutL/M variants. *D. dadantii* A5434ΔoutL *pecS* cells, carrying a pTdB-oLoM plasmid co-expressing mutant outL and outM alleles (indicated on top), were grown, treated and analyzed with either GST-OutL antibodies (A), or PelD and PelI antibodies (B), as in Fig. 4. The positions of OutL monomers (1-m) and dimers (2-m) are indicated by arrowheads. Non-specific species interacting with GST-OutL antibodies are shown by asterisks. In (A), the amounts of formed dimers reflect the proximity of the respective residues from adjacent protomers. In (B), the quantity of secreted proteins present in the culture supernatant reflects the efficiency of secretion.

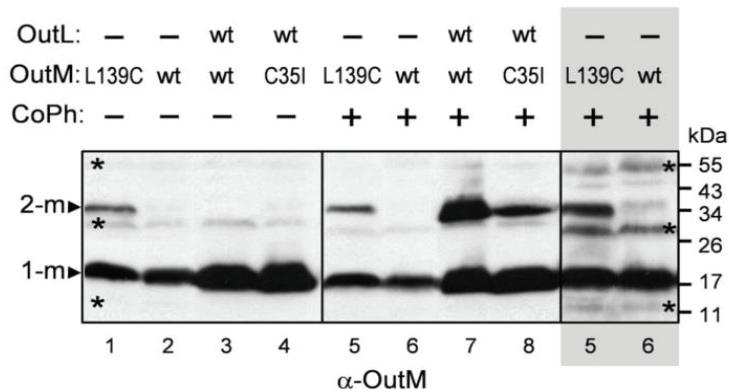


Figure S3. Co-expression of OutL with OutM provokes a rearrangement of the OutM TMS.

Disulfide-bonding analysis of OutL/M variants. *D. dadantii* A4229 cells, carrying either a pTdB-oM or a pTdB-oLoM plasmid expressing indicated outL and outM variants (on top), were grown to steady state and were either directly treated with iodoacetamide (CoPh -), to block any remaining free thiol groups or were firstly incubated with the oxidation catalyst (CoPh +) before the iodoacetamide treatment. The extent of disulfide bonding was assessed using non-reducing SDS-PAGE, followed by immunoblotting with OutM-antibodies. The positions of OutM monomers (1-m) and dimers (2-m) are indicated by arrowheads. Non-specific specie interacting with OutM antibodies are shown by asterisks. The amounts of dimers reflect the proximity of the respective residues from adjacent protomers.

Note that the co-expression of OutL with OutM provoked a significant increase in the quantity of OutM (compare lanes 1 and 2 to 3 and 4) and also a CoPh-induced homodimerization of OutM (compare lanes 6 to 7). The two right lanes (shaded) were overexposed to better show the absence of dimer of OutM^{WT}. The introduction of the C35I substitution in the OutL/OutM pair diminished the quantity of CoPh-induced homodimer (compare lanes 7 to 8).

Plasmid construction

To create pET-oM plasmid producing 6HisOutM, the outM gene fragment was amplified using the OuMHis and OuMER primers and cloned into the NdeI/EcoRI sites of pET20b(+). To generate pTdB-oM expressing 6His-outM, under the control of PpelC, the BglII/EcoRI outM gene fragment preceded by an RBS was subcloned from pET-oM into the BamHI/EcoRI sites of pTdB-oC in the place of outC. pET-oL and pTdB-oL plasmids were constructed by a similar way using the OuLHis and OuLER primers. To create pTdB-oLoM plasmid, co-expressing outL-outM, the outL-M gene fragment was amplified using the OuLHis and OuMER primers and cloned as above.

To generate T18/T25-Out fusions, an appropriate out gene fragment was amplified by PCR and fused in frame to the 3'-end of *cya* gene fragments coding for either T18 or T25 domain of adenylate cyclase on the plasmids pUT18C and pKT25, respectively (Table S1). To generate T25/T18-TMS-BlaM fusions, the PvuII/EcoRI *blaM* gene fragment (Broome-Smith et al., 1990) was in addition fused to the 3'-end of the out_{TMS} gene fragment (Table S1 and Fig. 2A, top right). To create pKT-GST-oLp plasmid expressing T25-gst-'outLp fusion, the *gst-outLp* gene fragment was subcloned from pGX-oLp plasmid into pKT-GST-oC₄₀₋₂₇₂ plasmid [13] by using the SfuI/EcoRI sites. To co-express the T25-OutLper fusion and the isolated OutMper region (pKT-oLp+Mp), the '*outM*' fragment coding for OutM₃₇₋₁₆₂ was cloned in a natural-like way, such that the beginning of outMp overlapped the translation stop of the *cya-outLp* fusion and the natural outMp RBS is located within the outLp coding region. Precisely, the outLp fragment was amplified using the OuLNhe and RCOuLNdRI primers while the outMp fragment was amplified using the OuMNde5' and OuMER primers and the two fragments were linked together via the generated NdeI sites (3' of outLp and 5' of outMp) and then cloned into the XbaI/EcoRI sites of pKT25.

Strain construction

The *D. dadantii* ΔoutL A3696 strain, carrying a deletion within the chromosomal outL allele, was constructed by marker exchange-eviction mutagenesis, as described previously [4]. Briefly, the *D. dadantii* A3688 strain, sucrose-sensitive and secretion-deficient since it carries the nptI-sacB-sacR (Km^R) cartridge into the chromosomal outL, was transformed with a pTdB-doL plasmid bearing an in frame deletion within the outL gene. Then, the mutant allele was exchanged for the chromosomal allele by selecting for sucrose tolerance and sensitivity to kanamycin. To construct *D. dadantii* outM::cat A5269 strain, first, a BamHI site was introduced into the outM gene using OuMBH2 and ROuMBH2 primers (Table S3). Next, the CmR gene cartridge was inserted into this site of outM onto the pTdB-oLoM plasmid and then, the outM::cat allele was introduced into the chromosome by gene exchange recombination. A correct recombination of the mutant alleles into the chromosome was checked by PCR.

Broome-Smith JK, Tadayyon M, Zhang Y (1990) Beta-lactamase as a probe of membrane protein assembly and protein export. *Mol Microbiol* 4: 1637–1644.

Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain	Genotype/phenotype	Reference
<i>Escherichia coli</i>		
BL21(DE3)	F ⁻ dcm ompT hsdSB(r _B ⁻ , m _B ⁻) gal lon λ(DE3)	Stratagene
DHP1	F ⁻ cya glnV44(AS) recA1 endA1 gyrA96 (Nal ^R) thi1 hsdR17 spoT1 rfbD1	[40]
NM522	supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (r _K ⁻ m _K ⁺) [F' proAB lacI ^q ΔM15]	Stratagene
<i>Dickeya dadantii</i>		
A3688	rafR ganB outL::nptI-sacB-sacR (Km ^R)	G. Condemine
A3696	rafR ganB ΔoutL	G. Condemine
A4229	rafR ganB	Laboratory collection
A5434	rafR ganB ΔoutL pecS::cat (Cm ^R)	This work
A5269	rafR ganB outM::cat (Cm ^R)	This work
Plasmids		
pTdB-oM ^a	pT7-6 carrying 6His-outM under PpelC	This work
pTdB-oL	pT7-6 carrying 6His-outL under PpelC	This work
pTdB-oLoM ^a	pT7-6 co-expressing outL and outM under PpelC	This work
Vectors expressing GST and 6His derivatives		
pET-20b(+)	Signal sequence and 6His-tag fusion vector, Ap ^R	Novagen
pQE32	6His-tag fusion vector, Ap ^R	Qiagen
pGEX-6P-3	GST-fusion vector with PreScission protease site, Ap ^R	GE Healthcare
pQE-oC	pQE32 carrying 6his-outC (aa 2 to 272)	[4]
pGX-oC	pGEX-6P-3 carrying gst-outC (aa 2 to 272)	[33]
pGX-oCp	pGEX-6P-3 carrying gst-outC' (aa 40 to 272)	[33]
pGX-oC _{TMS}	pGEX-6P-3 carrying gst-outC' (aa 2 to 42)	[33]
pET-oM	pET-20b(+) carrying 6his-outM (aa 2 to 162)	This work
pGX-oM	pGEX-6P-3 carrying gst-outM (aa 2 to 162)	This work
pGX-oMp	pGEX-6P-3 carrying gst-outM' (aa 38 to 162)	This work
pGX-oM _{TMS}	pGEX-6P-3 carrying gst-outM' (aa 2 to 37)	[13]
pET-oL	pET-20b(+) carrying 6his-outL (aa 2 to 400)	This work
pGX-oL	pGEX-6P-3 carrying gst-outL (aa 2 to 400)	This work
pGX-oLp	pGEX-6P-3 carrying gst-outL (aa 264 to 400)	This work
pGX-oLΔp	pGEX-6P-3 carrying gst-outL' (aa 1 to 265)	This work
Two-hybrid vectors		
pKT25	pSU40 derivative coding T25 fragment of CyaA, Kn ^R	[40]
pUT18C	pUC19 derivative coding T18 fragment of CyaA, Ap ^R	[40]
pUT18CCm	pUT18C carrying cat in place of blaM, Cm ^R	This work
pKT-oC	pKT25 carrying T25-outC (aa 2 to 272)	[33]
pKT-oCp	pKT25 carrying T25-outC' (aa 40 to 272)	[33]
pKT-C _{TMS} -Bla	pKT25 carrying T25-outC'-blaM (aa 2 to 47)	This work
pUT-oC	pUT18C carrying T18-outC (aa 2 to 272)	[33]

pUT-oCp	pUT18C carrying T18-‘outC (aa 40 to 272)	[33]
pUT-C _{TMS} -Bla	pUT18C carrying T18-outC’-blaM (aa 2 to 47)	This work
pKT-oLΔc	pKT25 carrying T25-‘outL (aa 244 to 400)	This work
pKT-oLp	pKT25 carrying T25-‘outL (aa 265 to 400)	This work
pKT-oL _{FLD}	pKT25 carrying T25-‘outL (aa 312 to 400)	This work
pKT-oLp+Mp	pKT25 coexpressing T25-‘outL (aa 265 to 400) and ‘outM (aa 38 to 162)	This work
pKT-GST-oLp	pKT25 carrying T25-gst-‘outL (aa 265 to 400)	This work
pKT-L _{TMS} -Bla	pKT25 carrying T25-outL’-blaM (aa 244 to 273)	This work
pUT-oLΔc	pUT18C carrying T18-‘outL (aa 244 to 400)	This work
pUT-oLp	pUT18C carrying T18-‘outL (aa 265 to 400)	This work
pUT-oL _{FLD}	pUT18C carrying T18-‘outL (aa 312 to 400)	This work
pUT-oLp+Mp	pUT18C coexpressing T18-‘outL (aa 265 to 400) and ‘outM (aa 38 to 162)	This work
pUT-L _{TMS} -Bla	pUT18C carrying T18-outL’-blaM (aa 244 to 273)	This work
pKT-oM	pKT25 carrying T25-‘outM (aa 3 to 162)	This work
pKT-oMp	pKT25 carrying T25-‘outM (aa 38 to 162)	This work
pKT-oM _{FLD}	pKT25 carrying T25-‘outM (aa 81 to 162)	This work
pKT-M _{TMS} -Bla	pKT25 carrying T25-outM’-blaM (aa 3 to 41)	This work
pUT-oM	pUT18C carrying T18-‘outM (aa 3 to 162)	This work
pUT-oMp	pUT18C carrying T18-‘outM (aa 38 to 162)	This work
pUT-oM _{FLD}	pUT18C carrying T18-‘outM (aa 81 to 162)	This work
pUT-oM _{ΔFLD}	pUT18C carrying T18-‘outM (aa 97 to 162)	This work
pUT-M _{TMS} -Bla	pUT18C carrying T18-outM’-blaM (aa 3 to 41)	This work
pUT-Tet _{TMS} -Bla	pUT18C carrying T18-tetA’-blaM (aa 4 to 34)	This work

^a Plasmids expressing cysteine variants of OutC and OutD are listed in the supplemental Table S2.

Table S2. Plasmids expressing cysteine variants of OutL and OutM used in this study

Plasmid	Expressed genes	Reference
Vectors expressing 6His-OutM variants under the control of PpelC		
pTdB-oM _{L122C}	outM (L122C)	This work
pTdB-oM _{A126C}	outM (A126C)	This work
pTdB-oM _{L139C}	outM (L139C)	This work
pTdB-oM _{V141C}	outM (V141C)	This work
pTdB-oM _{V144C}	outM (V144C)	This work
pTdB-oM _{P145C}	outM (P145C)	This work
pTdB-oM _{C22I/C29V}	outM (C22I/C29V)	This work
pTdB-oM _{C35I}	outM (C35I)	This work
pTdB-oM _{C22I/C29V/P145C}	outM (C22I/C29V/P145C)	This work
pTdB-oM _{C22I/C29V/A126C/P145C}	outM (C22I/C29V/A126C/P145C)	This work
pTdB-oM _{C35I/P145C}	outM (C35I/P145C)	This work
pTdB-oM _{C35I/A126C/P145C}	outM (C35I/A126C/P145C)	This work
pTdB-oM _{L122C/A126C}	outM (L122C/A126C)	This work
pTdB-oM _{L122C/L139C}	outM (L122C/L139C)	This work
pTdB-oM _{L122C/V141C}	outM (L122C/V141C)	This work
pTdB-oM _{L122C/V144C}	outM (L122C/V144C)	This work
pTdB-oM _{L122C/P145C}	outM (L122C/P145C)	This work
pTdB-oM _{A126C/L139C}	outM (A126C/L139C)	This work
pTdB-oM _{A126C/V144C}	outM (A126C/V144C)	This work
pTdB-oM _{A126C/P145C}	outM (A126C/P145C)	This work
pTdB-oM _{L122C/A126C/V141C}	outM (L122C/A126C/V141C)	This work
pTdB-oM _{L122C/A126C/P145C}	outM (L122C/A126C/P145C)	This work
Vectors coexpressing OutL and OutM variants under the control of PpelC		
pTdB-oLoM _{L122C/L139C}	outL(WT) and outM(L122C/L139)	This work
pTdB-oL _{I378C} oM	outL(I378C) and outM(WT)	This work
pTdB-oL _{P380C} oM	outL(P380C) and outM(WT)	This work
pTdB-oL _{G381C} oM	outL(G381C) and outM(WT)	This work
pTdB-oL _{I378C} oM _{L122C}	outL(I378C) and outM(L122C)	This work
pTdB-oL _{I378C} oM _{A126C}	outL(I378C) and outM(A126C)	This work
pTdB-oL _{I378C} oM _{L139C}	outL(I378C) and outM(L139C)	This work
pTdB-oL _{I378C} oM _{L122C/L139C}	outL(I378C) and outM(L122C/L139)	This work
pTdB-oL _{I378C} oM _{V144C}	outL(I378C) and outM(V144C)	This work
pTdB-oL _{I378C} oM _{P145C}	outL(I378C) and outM(P145C)	This work
pTdB-oL _{G381C} oM _{L122C}	outL(G381C) and outM(L122C)	This work
pTdB-oL _{G381C} oM _{A126C}	outL(G381C) and outM(A126C)	This work
pTdB-oL _{G381C} oM _{L139C}	outL(G381C) and outM(L139C)	This work
pTdB-oL _{G381C} oM _{L122C/L139C}	outL(G381C) and outM(L122C/L139)	This work
pTdB-oL _{G381C} oM _{V144C}	outL(G381C) and outM(V144C)	This work
pTdB-oL _{G381C} oM _{P145C}	outL(G381C) and outM(P145C)	This work
pTdB-oL _{G381C} oM _{L122C/P145C}	outL(G381C) and outM(L122/P145C)	This work
pTdB-oL _{G381C} oM _{A126C/P145C}	outL(G381C) and outM(A126/P145C)	This work

Table S3. Primers employed in the study

Primer	Nucleotide sequence (5'–3') ^b	Generated mutation
OuMC22I ^a	cgaatgatgacgctggc gac ggcggtctgtactgttg	OutMC22I
OuMC29V ^a	ggcggtctgtactgttg gtc ctgctgtattatctgtgc	OutMC29V
OuMC35I ^a	gcctgctgtattatct gac tctgggcaccgtggcagg	OutMC35I
OuMY33C/C35I ^a	ctgttgctgctgtgtatt gtc tctgacgtgggcaccgtgg	OutMY33C/C35I
OuML34C/C35I ^a	gttgctgctgtgtatt tgcat ctgggcaccgtggcag	OutML34C/C35I
OuML122C ^a	cgtagcgattcaacaacct gtg ccactggctggctgaactgg	OutM L122C
OuMA126C ^a	caacctgctgactggct gtg tgaactggagcagaaaaacg	OutM A126C
OuML122C/ A126C ^a	caacct gtg ccactggct gtg tgaactggagcagaaaaacg	OutM L122C/A126C
OuML139C ^a	cggcgtgatcaccagggg gtg cgtatgtcacggcggttcccaacag	OutM L139C
OuMV141C ^a	cgtgatcaccagggggttgatt tg cacggcggttcccaacagcgc	OutM V141C
OuMV144C ^a	cagggggttgatgtcacggcg gtg tcccaacagcggcgcatggtg	OutM V144C
OuMP145C ^a	gggttgatgtcacggcg gtt gcaacagcggcgcatggtggag	OutM P145C
OuLI378C ^a	gcaggctcaggcatatttccag tg cccggcggtgaaatgaagcag	OutL I378C
OuLP380C ^a	ctcaggcatatttccagatccc gtg cggtgaaatgaagcaggaaaaagac	OutL P380C
OuLG381C ^a	gcattttccagatcccggc gtg tgaatgaagcaggaaaaag	OutL G381C
OuMXba	gcgctctaga attgcgtcgccgctgg	XbaI, aa 2 of OutM
OuMER	gaattc gcatcgattacagc	EcoRI, after outM
OuMHis	catatgcaccatcaccatcaccata atgaattgcgtcgc	NdeI and 6His before outM
OuMNde5'	ccggcatatg gcaccgtggcaggagcg	NdeI before outM _{per}
OuMBH2 ^a	gctgtattatctgtgctgg atc cggtggcaggagcggg	BamHI, aa 36 and 37 of OutM
OuMXba-sh ^a	gcacggcggcagatcgccgg ctctag acatcagcctgacggtgttg	XbaI, aa 80 of OutM
OuMPst-sh ^a	gcaaagcgcgcccg ctgcag catcaccgtgctgcgtatg	PstI, aa 95 and 96 of OutM
OuMEcl136 ^a	gggcaccgtggcaggag ctc gcgcgacagtggcagatgac	Ecl136II, aa 42 of OutM
OuLHpa ^a	gtacgcgcgggtgaaacct gtta acaggcggtgttgcctggc	HpaI, aa 241 and 242 of OutL
OuLNhe ^a	ggctgctgctggt gctagc agagctgtctggaccattac	NheI, aa 266 of OutL
OuLHis	catatgcaccatcaccatcaccata acaggcgccgacaacg	NdeI and 6His before outL
OuLER	gggaattc atggctgactcctcag	EcoRI after outL
RCOuLNdRI	gtcagtcacgatgaattcat atg tgactcctcagaattaactg	NdeI and EcoRI after outL

^a For each primers used in site directed mutagenesis, another primer with reverse complementary sequence was used (not shown).

^b Mutated or introduced bases are in bold italic. Introduced restriction nuclease sites are underlined.

Annexe III.

Souches bactériennes, plasmides et oligonucléotides utilisés.

Souches bactériennes.

Nom	Génotype	Source
<i>Escherichia coli</i>		
NM522	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (r_K⁻ m_K⁺) [F' proAB lacI^qZΔM15]</i>	Stratagene
MC4100	F ⁻ <i>araD139 deoC1 flbB5301 ptsF25 rbsR relA1 rpsL150 Δ(argF-lac)U169</i>	Casadaban, 1976
DH10B	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1endA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ-</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
PAP5295	<i>ΔmalE malG501 F⁻lacI^q araD139 deoC1 flbB5301 ptsF25 rbsR relA1 rpsL150 Δ(argF-lac)U169</i>	Olivera Francetic
<i>Dickeya dadantii</i>		
A576	<i>lacZ2 arg-10 kdgK</i>	Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1987
A3756	<i>lacZ2 pell::uidA(Kan^R)</i>	Pineau <i>et al.</i> , 2014
A5413	<i>lacZ2 ΔoutC (ΔMamI-Asp700) pell::uidA(Kan^R)</i>	Pineau <i>et al.</i> , 2014
A5588	<i>lacZ2 ΔoutC (ΔMamI-Asp700) pell::cat (Cm^R)</i>	Pineau <i>et al.</i> , 2014

Plasmides.

Nom	Description	Source
pBAD-ELM	pBAD exprimants HA-OutE, VSV-OutL et cMyc-OutM	B. Py
pTdB	pT7-6 carrying <i>PpelC</i>	Bouley <i>et al.</i> , 2001
pSup	pSup-BpaRS-6TRN	Ryu & Schultz, 2006
pBS-PLI(T53TAG)	pBS-PLI portant la mutation T53TAG	Ce travail
pBS-PLI(T54TAG)	pBS-PLI portant la mutation T54TAG	Ce travail
pBS-PLI(S55TAG)	pBS-PLI portant la mutation S55TAG	Ce travail
pBS-PLI(N56TAG)	pBS-PLI portant la mutation N56TAG	Ce travail
pBS-PLI(P57TAG)	pBS-PLI portant la mutation P57TAG	Ce travail
pBS-PLI(D58TAG)	pBS-PLI portant la mutation D58TAG	Ce travail
pBS-PLI(L59TAG)	pBS-PLI portant la mutation L59TAG	Ce travail
pBS-PLI(R60TAG)	pBS-PLI portant la mutation R60TAG	Ce travail
pBS-PLI(E61TAG)	pBS-PLI portant la mutation E61TAG	Ce travail
pBS-PLI(I63TAG)	pBS-PLI portant la mutation I63TAG	Ce travail
pBS-PLI(A64TAG)	pBS-PLI portant la mutation A64TAG	Ce travail
pBS-PLI(V65TAG)	pBS-PLI portant la mutation V65TAG	Ce travail
pBS-PLI(L66TAG)	pBS-PLI portant la mutation L66TAG	Ce travail
pBS-PLI(T78TAG)	pBS-PLI portant la mutation T78TAG	Ce travail
pBS-PLI(S80TAG)	pBS-PLI portant la mutation S80TAG	Ce travail
pBS-PLI(G81TAG)	pBS-PLI portant la mutation G81TAG	Ce travail
pBS-PLI(L82TAG)	pBS-PLI portant la mutation L82TAG	Ce travail
pBS-PLI(N83TAG)	pBS-PLI portant la mutation N83TAG	Ce travail
pBS-PLI(E93TAG)	pBS-PLI portant la mutation E93TAG	Ce travail
pBS-PLI(N94TAG)	pBS-PLI portant la mutation N94TAG	Ce travail
pTdB-oCD	pT7-6 avec les gènes <i>outC</i> et <i>outD</i> de <i>D.dadantii</i> sous le control de <i>PpelC</i>	Wang <i>et al.</i> , 2012
pTdB-oCDS	pTdB-oCD portant <i>outS</i> of <i>D.dadantii</i>	Ce travail
pTdB-oC(G99TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (G99TAG)	Ce travail
pTdB-oC(V100TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (V100TAG)	Ce travail
pTdB-oC(M101TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (M101TAG)	Ce travail
pTPLB-oC(M101TAG)DS	pTdB-oC(M101TAG)DS portant <i>pelB</i> de <i>D.dadantii</i>	Ce travail
pTdB-oC(N125TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (N125TAG)	Ce travail
pTdB-oC(E126TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (E126TAG)	Ce travail
pTPLB-oC(E126TAG)DS	pTdB-oC(E126TAG)DS portant <i>pelB</i> de <i>D.dadantii</i>	Ce travail
pTdB-oC(E127TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (E127TAG)	Ce travail
pTPLB-oC(E127TAG)DS	pTdB-oC(E127TAG)DS portant <i>pelB</i> de <i>D.dadantii</i>	Ce travail
pTdB-oC(P129TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (P129TAG)	Ce travail
pTdB-oC(N132TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (N132TAG)	Ce travail
pTPLB-oC(N132TAG)DS	pTdB-oC(N132TAG)DS portant <i>pelB</i> de <i>D.dadantii</i>	Ce travail
pTdB-oC(V143TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (V143TAG)	Ce travail
pTdB-oC(V144TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (V144TAG)	Ce travail
pTdB-oC(V145TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (V145TAG)	Ce travail
pTdB-oC(V153TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (V153TAG)	Ce travail
pTdB-oC(L154TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (L154TAG)	Ce travail
pTdB-oC(L154TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (L154TAG)	Ce travail
pTdB-oC(L154TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (L154TAG)	Ce travail

pTdB-oC(P192TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (P192TAG)	Ce travail
pTdB-oC(M194TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (M194TAG)	Ce travail
pTdB-oC(K198TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (K198TAG)	Ce travail
pTdB-PLI-oC(K198TAG)DS	pTdB-oC(K198TAG)DS portant <i>pell</i> de <i>D.dadantii</i>	Ce travail
pTdB-oC(L199TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (L199TAG)	Ce travail
pTdB-oC(A235TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (A235TAG)	Ce travail
pTdB-PLI-oC(A235TAG)DS	pTdB-oC(A235TAG)DS portant <i>pell</i> de <i>D.dadantii</i>	Ce travail
pTdB-oC(E236TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (A235TAG)	Ce travail
pTdB-oC(K239TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (K239TAG)	Ce travail
pTPLB-oC(K239TAG)DS	pTdB-oC(K239TAG)DS portant <i>pelB</i> de <i>D.dadantii</i>	Ce travail
pTdB-PLI-oC(K239TAG)DS	pTdB-oC(K239TAG)DS portant <i>pell</i> de <i>D.dadantii</i>	Ce travail
pTPLB-oC(K239TAG)ΔDS	pTPLBoC(K239TAG)DS portant la délétion dans <i>outD</i>	Ce travail
pTdB-oCD(K239TAG)	pTdB-oCD portant <i>outC</i> (K239TAG)	Ce travail
pTdB-oC(M242TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (M242TAG)	Ce travail
pTdB-PLI-oC(M242TAG)DS	pTdB-oC(M242TAG)DS portant <i>pell</i> de <i>D.dadantii</i>	Ce travail
pTdB-oC(E243TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (E243TAG)	Ce travail
pTdB-oC(A246TAG)DS	pTdB-oCDS portant <i>outC</i> (A246TAG)	Ce travail
pTdB-PLI-oC(A246TAG)DS	pTdB-oC(A246TAG)DS portant <i>pell</i> de <i>D.dadantii</i>	Ce travail
pTdB-PLI-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> of <i>D.dadantii</i>	Ce travail
pTdB-PLI(Y50TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (Y50TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(T53TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (T53TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(T54TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (T54TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(S55TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (S55TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(N56TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (N56TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(P57TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (P57TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(D58TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (D58TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(R60TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (R60TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(E61TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (E61TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(I63TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (I63TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(A64TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (A64TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(V65TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (V65TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(L66TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (L66TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(V65TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (V65TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(L66TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (L66TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(W85TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (W85TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(V90TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (V90TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(V91TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (V91TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(A106TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (A106TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(P107TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (P107TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(N108TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (N108TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(A109TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (A109TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(G110TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (G110TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(N145TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (N145TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(D146TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (D146TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(K149TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (K149TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(K215TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (K215TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(Y218TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (Y218TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(K221TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (K221TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(D223TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (D223TAG)	Ce travail

pTdB-PLI(K221TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (K221TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(D58TAG)-oC _{APDZ} DS	pTdB-PLI(D58TAG)-oCDS portant <i>outC</i> (Q171TAA)	Ce travail
pTdB-PLI(K317TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (K317TAG)	Ce travail
pTdB-PLI(Q319TAG)-oCDS	pTdB-oCDS portant <i>pell</i> (Q319TAG)	Ce travail

Oligonucléotides.

Nom	Nucleotide sequence (5'-3') ^b	Mutation
PLI_S42TAG ^a	ctgggctggtctaccgacgaat tag aaagtggcgcgtcaggaag	Fn3(PelI)S42TAG
PLI_K43TAG ^a	ctggtctaccgacgaaagt tag gtggcgcgtcaggaagttatc	Fn3(PelI)K43TAG
PLI_Y50TAG ^a	gtggcgcgtcaggaagtt tag cgcggcactaccagcaaccctg	Fn3(PelI)Y50TAG
PLI_T53TAG ^a	gtcaggaagttatcgcggt tag accagcaaccctgacctgc	Fn3(PelI)T53TAG
PLI_T54TAG ^a	caggaagttatcgcggcact tag agcaaccctgacctgcgtc	Fn3(PelI)T54TAG
PLI_S55TAG ^a	gaagttatcgcggcactac tag aaccctgacctgcgtgaac	Fn3(PelI)S55TAG
PLI_N56TAG ^a	ggaagttatcgcggcact tag cctgcgtgaacgtatcgccg	Fn3(PelI)N56TAG
PLI_P57TAG ^a	cgcggcactaccagcaact tag gacctgcgtgaacgtatc	Fn3(PelI)P57TAG
PLI_D58TAG ^a	cggcactaccagcaaccct tag ctgcgtgaacgtatcgccg	Fn3(PelI)D58TAG
PLI_L59TAG ^a	cactaccagcaaccctgact tag cggtgaacgtatcgccgtg	Fn3(PelI)L59TAG
PLI_R60TAG ^a	ctaccagcaaccctgacctg tag gaacgtatcgccgtggacg	Fn3(PelI)R60TAG
PLI_E61TAG ^a	cagcaaccctgacctgcgt tag cgatcgccgtggacgcggaaac	Fn3(PelI)E61TAG
PLI_I63TAG ^a	ccctgacctgcgtgaacgt tag gccgtgctggacgcggaaac	Fn3(PelI)I63TAG
PLI_A64TAG ^a	cctgacctgcgtgaacgtatc tag gtgctggacgcggaaacc	Fn3(PelI)A64TAG
PLI_V65TAG ^a	gacctgcgtgaacgtatcgcc tag ctggacgcggaaaccctgac	Fn3(PelI)V65TAG
PLI_L66TAG ^a	cctgcgtgaacgtatcgccgt tag gacgcggaaaccctgacc	Fn3(PelI)L66TAG
PLI_T78TAG ^a	gtacctttaaagatgccgact tag aatagcggcctcaattactg	Fn3(PelI)T78TAG
PLI_S80TAG ^a	ctttaaagatgccgacaccaat tag ggcctcaattactggtactgggtg	Fn3(PelI)S80TAG
PLI_G81TAG ^a	ctttaaagatgccgacaccaatag tag ctcaattactggtactgggtg	Fn3(PelI)G81TAG
PLI_L82TAG ^a	gccgacaccaatagcggc tag aattactggtactgggtggacg	Fn3(PelI)L82TAG
PLI_N83TAG ^a	gatgccgacaccaatagcggcct tag tactggtactgggtggac	Fn3(PelI)N83TAG
PLI_W85TAG ^a	ccaatagcggcctcaattactag tag tactgggtggacgtcgcagc	Fn3(PelI)W85TAG
PLI_V90TAG ^a	ctggtactgggtggact tag gtcagcgaaaatcaggctcagg	Fn3(PelI)V90TAG
PLI_V91TAG ^a	ctggtactgggtggacgtc tag agcggaaaatcaggctcagg	Fn3(PelI)V91TAG
PLI_E93TAG ^a	ctgggtggacgtcgtcagct tag aatcaggctcaggctcgtatc	Fn3(PelI)N83TAG
PLI_N94TAG ^a	gtggacgtcgtcagcgaat tag caggctcaggctcgtatcaaatg	Fn3(PelI)N94TAG
PLI_A106TAG ^a	gtatcaaatgccgtcaccac tag ccgaacgccggcccgtg	PelIA106TAG
PLI_P107TAG ^a	caaatgccgtcaccaccgcat tag aacgccggcccgtgcgcgcag	PelIP107TAG
PLI_N108TAG ^a	gccgtcaccaccgcacc tag gccggcccgtgcgcgcag	PelIN108TAG

PLI_A109TAG ^a	gtcaccaccgcaccgaact tag ggcccgcgtgcgcgcagcgaaag	PelIA109TAG
PLI_G110TAG ^a	gtcaccaccgcaccgaacgcct tag ccgcgtgcgcgcagcgaaag	PelIG110TAG
PLI_N145TAG ^a	gaccatcgggcacctcctgtccg tag gacagcgacaagcagaaaac	PelIN145TAG
PLI_D146TAG ^a	catcggcacctcctgtccgaattagagcgacaagcagaaaccgctg	PelID146TAG
PLI_K149TAG ^a	ctcctgtccgaatgacagcgact tag cagaaaaccgctgatcattctg	PelIK149TAG
PLI_K215TAG ^a	cgggatcggcataacgcct tag gacgggtatggcggcaaaccggac	PelIK215TAG
PLI_Y218TAG ^a	gcataacgccaaagacggtt ag ggcggcaaaccggacaaagtg	PelIY218TAG
PLI_K221TAG ^a	caaagacgggtatggcgg ctag ccggacaaagtctgcagcac	PelIK221TAG
PLI_D223TAG ^a	gacgggtatggcggcaaacc gtag aaagtctgcagcacaattc	PelID223TAG
PLI_K317TAG ^a	gagttcaaaggcgtagtat ag ggccagggtcaacggaaaaatac	PelIK317TAG
PLI_Q319TAG ^a	gagttcaaaggcgtagtat ag ggccagggtcaacggaaaaatac	PelIQ319TAG
OuC_G99TAG ^a	ctagctgaacctttcgtgacct tag gtcatggccggcgatgac	OutCG99TAG
OuC_V100TAG ^a	ctgaacctttcgtgaccgg ctag atggccggcgatgacgattcc	OutCV100TAG
OuC_M101TAG ^a	gaacctttcgtgaccggcg cttag gccggcgatgacgattccccg	OutCM101TAG
OuC_N125TAG ^a	gaacagttcagtcgtggcg cttag gaagaggttcctggctataac	OutCN125TAG
OuC_E126TAG ^a	gttcagtcgtggcg cttag gaggttcctggctataacgc	OutCE126TAG
OuC_E127TAG ^a	gttcagtcgtggcg cttag aatgaggttcctggctataacgc	OutCE127TAG
OuC_N132TAG ^a	caatgaagaggttcctggctatt ag gccaaaatcgatcgatccg	OutCE127TAG
OuC_V144TAG ^a	cgatccggccggatagagt gtag ctgcagtatcaagggcggttatg	OutCV144TAG
OuC_V145TAG ^a	gatccggccggatagagt gttag cagtatcaagggcggttatg	OutCV144TAG
OuC_V153TAG ^a	cagtatcaagggcggttatgaat tag ctgggattgtacagccaggag	OutCV153TAG
OuC_L154TAG ^a	gtatcaagggcggttatgaagt tag ggattgtacagccaggagg	OutCL154TAG
OuC_Q171TAA ^a	cggacggcggttcctggcg cta agtcacgagcttcagc	OutCQ171TAA
OuC_P192TAG ^a	gcgattacgtctctttctc cttag atcatgaacgacaacaag	OutCP192TAG
OuC_M194TAG ^a	cgtctctttctccccgat cttag aacgacaacaagttgcag	OutCM194TAG
OuC_K198TAG ^a	ctccccgatcatgaacgaca actag ttgcagggtaccggttg	OutC K198TAG
OuC_L199TAG ^a	cgatcatgaacgaca actag cagggctaccggttgaatc	OutCL199TAG
OuC_A235TAG ^a	ctgaacgggttggtattgcgcgatt ag gagcaggcgaaaaaagcc	OutCA235TAG
OuC_E236TAG ^a	gttggtattgcgcgatgc gttag caggcgaaaaaagccatg	OutCE236TAG
OuC_K239TAG ^a	gcgatgcggagcaggcg tag aaagccatggaacgcgatggctg	OutCK239TAG
OuC_M242TAG ^a	gcggagcaggcgaaaaa agccta ggaacgcgatggctgatgtgc	OutCM242TAG
OuC_E243TAG ^a	gcaggcgaaaaaagccat gtag cgcgatggctgatgtgcataac	OutCE243TAG
OuC_A246TAG ^a	gaaaaaagccatggaacgc atgtag gatgtgcataactttaccctg	OutCA246TAG
5'SacIOuS	gagct cacgcacgtgcgcttc	
3'EcoRIOuS	gaattct gcacatcatgcagt	

Références bibliographiques.

- Abendroth, J., Kreger, A., & Hol, W. (2009). The dimer formed by the periplasmic domain of EpsL from the Type 2 Secretion System of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Struct Biol*, 168(2), 313-22.
- Abendroth, J., Mitchell, D., Korotkov, K., Johnson, T., Kreger, A., Sandkvist, M., & Hol, W. (2009). The three-dimensional structure of the cytoplasmic domains of EpsF from the type 2 secretion system of *Vibrio cholerae*. *J Struct Biol*, 166(3), 303-15.
- Abendroth, J., Murphy, P., Sandkvist, M., Bagdasarian, M., & Hol, W. (2005). The X-ray structure of the type II secretion system complex formed by the N-terminal domain of EpsE and the cytoplasmic domain of EpsL of *Vibrio cholerae*. *J Mol Biol*, 348(4), 845-55.
- Abendroth, J., Rice, A., McLuskey, K., Bagdasarian, M., & Hol, W. (2004). The crystal structure of the periplasmic domain of the type II secretion system protein EpsM from *Vibrio cholerae*: the simplest version of the ferredoxin fold. *J Mol Biol*, 338(3), 585-96.
- Adam, P. R., Patil, M. K., Dickenson, N. E., Choudhari, S., Barta, M., Geisbrecht, B. V., Picking, W. D. (2012). Binding affects the tertiary and quaternary structures of the *Shigella* translocator protein IpaB and its chaperone IpgC. *Biochemistry*, 51(19), 4062-4071.
- Akeda, Y., Galán, J. E. (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*. 6(437), 911-5.
- Alami, M., Luke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H., Brunner, J., & Muller, M. (2003). Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Mol Cell*, 12(4), 937-46.
- Albers, S. V. & Meyer, B. H. (2011) The archaeal cell envelope. *Nat Rev Microbiol.*, 9(6), 414-26.
- Albers, S., & Pohlschroder, M. (2009). Diversity of archaeal type IV pilin-like structures. *Extremophiles*, 13(3), 403-10.
- Albers, S.-V., Szabo, Z., & Driessen, A. J. M. (2003). Archaeal Homolog of Bacterial Type IV Prepilin Signal Peptidases with Broad Substrate Specificity. *Journal of Bacteriology*, 185(13), 3918-3925. doi:10.1128/JB.185.13.3918-3925.2003
- Alder, N., & Theg, S. (2003). Energetics of protein transport across biological membranes. a study of the thylakoid DeltapH-dependent/cpTat pathway. *Cell*, 112(2), 231-42.
- Aldridge, C., Spence, E., Kirkilionis, M., Frigerio, L., & Robinson, C. (2008). Tat-dependent targeting of Rieske iron-sulphur proteins to both the plasma and thylakoid membranes in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Mol Microbiol*, 70(1), 140-50.
- Alphonse, S., Durand, E., Douzi, B., Waegele, B., Darbon, H., Filloux, A., Bernard, C. (2010). Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT pseudopilin, a major component of the type II secretion system. *J Struct Biol*, 169(1), 75-80.
- Alvarez-Martinez, C. E., & Christie, P. J. (2009). Biological Diversity of Prokaryotic Type IV Secretion Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(4), 775-808.
- Anderson, D. M., & Schneewind, O. (1997). A mRNA Signal for the Type III Secretion of Yop Proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science*, 278(5340), 1140-1143.
- Arts, J., de Groot, A., Ball, G., Durand, E., Khattabi, M. E., Filloux, A., Koster, M. (2007). Interaction domains in the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretory apparatus component XcpS (GspF). *Microbiology*, 153(5), 1582-1592.
- Aschtgen, M.S., Bernard, C. S., De Bentzmann, S., Lloubes, R., & Cascales, E. (2008). SciN Is an Outer Membrane Lipoprotein Required for Type VI Secretion in Enterococcal *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190(22), 7523-7531.
- Ast, V., Schoenhofen, I., Langen, G., Stratilo, C., Chamberlain, M., & Howard, S. (2002). Expression of the ExeAB complex of *Aeromonas hydrophila* is required for the localization and assembly of the ExeD secretion port multimer. *Mol Microbiol*, 44(1), 217-31.

- Atmakuri, K., Cascales, E., & Christie, P. (2004). Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol*, 54(5), 1199-211.
- Ayers, M., Sampaleanu, L., Tammam, S., Koo, J., Harvey, H., Howell, P., & Burrows, L. (2009). PilM/N/O/P proteins form an inner membrane complex that affects the stability of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin. *J Mol Biol*, 394(1), 128-42.
- Bagdasarian, M., Sandkvist, M., & Hol, W. (2004). The structure of the cytoplasmic domain of EpsL, an inner membrane component of the type II secretion system of *Vibrio cholerae*: an unusual member of the actin-like ATPase superfamily. *J Mol Biol*, 344(3), 619-33.
- Bakkes, P. J., Jenewein, S., Smits, S. H. J., Holland, I. B., & Schmitt, L. (2010). The Rate of Folding Dictates Substrate Secretion by the *Escherichia coli* Hemolysin Type 1 Secretion System. *Journal of Biological Chemistry*, 285(52), 40573-40580.
- Balakrishnan, L., Hughes, C., & Koronakis, V. (2001). Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 313(3), 501-10.
- Bardy, S. L., & Jarrell, K. F. (2003). Cleavage of preflagellins by an aspartic acid signal peptidase is essential for flagellation in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Molecular Microbiology*, 50(4), 1339-1347.
- Barnard, T., Dautin, N., Lukacik, P., Bernstein, H., & Buchanan, S. (2007). Autotransporter structure reveals intra-barrel cleavage followed by conformational changes. *Nat Struct Mol Biol*, 14(12), 1214-20.
- Baron, C. (2006). VirB8: a conserved type IV secretion system assembly factor and drug target. *Biochem Cell Biol*, 84(6), 890-9.
- Basler, M., Ho, B. T., & Mekalanos, J. J. (2013). Tit-for-Tat: Type VI Secretion System Counterattack during Bacterial Cell-Cell Interactions. *Cell*, 152(4), 884-894.
- Basler, M., & Mekalanos, J. J. (2012). Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 815.
- Bechtluft, P., van Leeuwen, R. G. H., Tyreman, M., Tomkiewicz, D., Nouwen, N., Tepper, H. L., Tans, S. J. (2007). Direct Observation of Chaperone-Induced Changes in a Protein Folding Pathway. *Science*, 318(5855), 1458-1461.
- Beck, D., Vasisht, N., Baglieri, J., Monteferrante, C. G., van Dijl, J. M., Robinson, C., & Smith, C. J. (2013). Ultrastructural characterisation of *Bacillus subtilis* TatA complexes suggests they are too small to form homooligomeric translocation pores. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(8), 1811-1819.
- Benabdelhak, H., Kiontke, S., Horn, C., Ernst, R., Blight, M., Holland, I., & Schmitt, L. (2003). A specific interaction between the NBD of the ABC-transporter HlyB and a C-terminal fragment of its transport substrate haemolysin A. *J Mol Biol*, 327(5), 1169-79.
- Benach, J., Chou, Y.T., Fak, J. J., Itkin, A., Nicolae, D. D., Smith, P. C., Hunt, J. F. (2003). Phospholipid-induced Monomerization and Signal-peptide-induced Oligomerization of SecA. *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 3628-3638.
- Bennett, J., & Hughes, C. (2000). From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. *Trends Microbiol*, 8(5), 202-4.
- Berks, B. (1996). A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol*, 22(3), 393-404.
- Berks, B., Sargent, F., & Palmer, T. (2000). The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol*, 35(2), 260-74.
- Bhatty, M., Laverde Gomez, J. A., & Christie, P. J. (2013). The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Research in Microbiology*, 164(6), 620-639. doi:10.1016/j.resmic.2013.03.012
- Bingle, L., Bailey, C., & Pallen, M. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol*, 11(1), 3-8.

- Birtalan, S., Phillips, R., & Ghosh, P. (2002). Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol Cell*, 9(5), 971-80.
- Bladergroen, M., Badelt, K., & Spaink, H. (2003). Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. *Mol Plant Microbe Interact*, 16(1), 53-64.
- Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Freudl, R., & Sprenger, G. A. (2003). Genetic Analysis of Pathway Specificity during Posttranslational Protein Translocation across the *Escherichia coli* Plasma Membrane. *Journal of Bacteriology*, 185(9), 2811-2819.
- Blaylock, B., Sorg, J.A., & Schneewind, O. (2008). *Yersinia enterocolitica* type III secretion of YopR requires a structure in its mRNA. *Molecular Microbiology*, 70(5), 1210-1222. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06474.x
- Bleves, S., Lazdunski, A., & Filloux, A. (1996). Membrane topology of three Xcp proteins involved in exoprotein transport by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 178(14), 4297-4300.
- Bolhuis, A., Mathers, J. E., Thomas, J. D., Barrett, C. M. L., & Robinson, C. (2001). TatB and TatC Form a Functional and Structural Unit of the Twin-arginine Translocase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20213-20219.
- Bonemann, G., Pietrosiuk, A., & Mogk, A. (2010). Tubules and donuts: a type VI secretion story. *Mol Microbiol*, 76(4), 815-21.
- Bortoli-German, I., Brun, E., Py, B., Chippaux, M., & Barras, F. (1994). Periplasmic disulphide bond formation is essential for cellulase secretion by the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol*, 11(3), 545-53.
- Botteaux, A., Sory, M. P., Biskri, L., Parsot, C., & Allaoui, A. (2009). MxiC is secreted by and controls the substrate specificity of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. *Molecular Microbiology*, 71(2), 449-460.
- Bouley, J., Condemine, G., & Shevchik, V. (2001). The PDZ domain of OutC and the N-terminal region of OutD determine the secretion specificity of the type II out pathway of *Erwinia chrysanthemi*. *J Mol Biol*, 308(2), 205-19.
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., & Attree, I. (2009). Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide *in silico* analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, 10, 104.
- Brandon, L. D., & Goldberg, M. B. (2001). Periplasmic Transit and Disulfide Bond Formation of the Autotransported *Shigella* Protein IcsA. *Journal of Bacteriology*, 183(3), 951-958.
- Braun, P., Ockhuijsen, C., Eppens, E., Koster, M., Bitter, W., & Tommassen, J. (2001). Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* Elastase. FORMATION OF THE DISULFIDE BONDS. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 26030-26035.
- Braun, P., Tommassen, J., & Filloux, A. (1996). Role of the propeptide in folding and secretion of elastase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 19(2), 297-306.
- Brillet, K., Journet, L., Célia, H., Paulus, L., Stahl, A., Pattus, F., & Cobessi, D. (2007). A beta strand lock exchange for signal transduction in TonB-dependent transducers on the basis of a common structural motif. *Structure (London, England: 1993)*, 15(11), 1383-1391.
- Brok, R., Van Gelder, P., Winterhalter, M., Ziese, U., Koster, A., de Cock, H., Bitter, W. (1999). The C-terminal domain of the *Pseudomonas* secretin XcpQ forms oligomeric rings with pore activity. *J Mol Biol*, 294(5), 1169-79.
- Brundage, L., Hendrick, J., Schiebel, E., Driessen, A., & Wickner, W. (1990). The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell*, 62(4), 649-57.
- Buddelmeijer, N., Francetic, O., & Pugsley, A. P. (2006). Green Fluorescent Chimeras Indicate Nonpolar Localization of Pullulanase Secretion Components Pull and PulM. *Journal of Bacteriology*, 188(8), 2928-2935.

- Buddelmeijer, N., Krehenbrink, M., Pecorari, F., & Pugsley, A. P. (2009). Type II Secretion System Secretin PulD Localizes in Clusters in the *Escherichia coli* Outer Membrane. *Journal of Bacteriology*, 191(1).
- Burghout, P., Beckers, F., de Wit, E., van Boxtel, R., Cornelis, G. R., Tommassen, J., & Koster, M. (2004). Role of the Pilot Protein YscW in the Biogenesis of the YscC Secretin in *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Bacteriology*, 186(16), 5366-5375.
- Burghout, P., van Boxtel, R., Van Gelder, P., Ringler, P., Muller, S. A., Tommassen, J., & Koster, M. (2004). Structure and Electrophysiological Properties of the YscC Secretin from the Type III Secretion System of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4645-4654.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., & Strelkov, S.V. (2003). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif *Trends in Cell Biology* , 11(2), 82 – 88.
- Burrows, L. (2005). Weapons of mass retraction. *Mol Microbiol*, 57(4), 878-88.
- Camberg, J., Johnson, T., Patrick, M., Abendroth, J., Hol, W., & Sandkvist, M. (2007). Synergistic stimulation of EpsE ATP hydrolysis by EpsL and acidic phospholipids. *EMBO J*, 26(1), 19-27.
- Camberg, J. L., & Sandkvist, M. (2005). Molecular Analysis of the *Vibrio cholerae* Type II Secretion ATPase EpsE. *Journal of Bacteriology*, 187(1), 249-256.
- Cambronne, E., & Roy, C. (2007). The *Legionella pneumophila* IcmSW complex interacts with multiple Dot/Icm effectors to facilitate type IV translocation. *PLoS Pathog*, 3(12), e188.
- Campos, M., Cisneros, D. A., Nivaskumar, M., & Francetic, O. (2013). The type II secretion system – a dynamic fiber assembly nanomachine. *Bacterial secretion systems: function and structural biology*, 164(6), 545-555.
- Campos, M., Nilges, M., Cisneros, D. A., & Francetic, O. (2010). Detailed structural and assembly model of the type II secretion pilus from sparse data. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 107(29), 13081-13086.
- Cao, T., & Saier, M. (2003). The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. *Biochim Biophys Acta*, 1609(1), 115-25.
- Carbonnelle, E., Helaine, S., Nassif, X., & Pelicic, V. (2006). A systematic genetic analysis in *Neisseria meningitidis* defines the Pil proteins required for assembly, functionality, stabilization and export of type IV pili. *Mol Microbiol*, 61(6), 1510-22.
- Casadaban, M. (1976). Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol*, 104(3), 541-55.
- Cascales, E., & Christie, P. J. (2004). Definition of a Bacterial Type IV Secretion Pathway for a DNA Substrate. *Science*, 304(5674), 1170-1173.
- Cescau, S., Debarbieux, L., & Wandersman, C. (2007). Probing the In Vivo Dynamics of Type I Protein Secretion Complex Association through Sensitivity to Detergents. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 1496-1504.
- Chami, M., Guilvout, I., Gregorini, M., Remigy, H. W., Muller, S. A., Valerio, M., Bayan, N. (2005). Structural Insights into the Secretin PulD and Its Trypsin-resistant Core. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), 37732-37741.
- Chandran, V., Fronzes, R., Duquerroy, S., Cronin, N., Navaza, J., & Waksman, G. (2009). Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature*, 462(7276), 1011-5.
- Chapon, V., Simpson, H., Morelli, X., Brun, E., & Barras, F. (2000). Alteration of a single tryptophan residue of the cellulose-binding domain blocks secretion of the *Erwinia chrysanthemi* Cel5 cellulase (ex-EGZ) via the type II system. *J Mol Biol*, 303(2), 117-23.
- Chen, Y., Shiue, S.J., Huang, C.W., Chang, J.L., Chien, Y.L., Hu, N.T., & Chan, N.L. (2005). Structure and Function of the XpsE N-Terminal Domain, an Essential Component of the *Xanthomonas campestris* Type II Secretion System. *Journal of Biological Chemistry*, 280(51), 42356-42363.

- Chen, Y., Zhang, X., Manias, D., Yeo, H.-J., Dunny, G. M., & Christie, P. J. (2008). *Enterococcus faecalis* PcfC, a spatially localized substrate receptor for type IV secretion of the pCF10 transfer intermediate. *Journal of Bacteriology*, 190(10), 3632-3645.
- Cheng, L. W., Kay, O., & Schneewind, O. (2001). Regulated secretion of YopN by the type III machinery of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5293-5301.
- Cianciotto, N. (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol*, 13(12), 581-8.
- Cisneros, D., Bond, P., Pugsley, A., Campos, M., & Francetic, O. (2012). Minor pseudopilin self-assembly primes type II secretion pseudopilus elongation. *EMBO J*, 31(4), 1041-53.
- Clantin, B., Delattre, A.-S., Rucktooa, P., Saint, N., Meli, A. C., Loch, C., Villeret, V. (2007). Structure of the Membrane Protein FhaC: A Member of the Omp85-TpsB Transporter Superfamily. *Science*, 317(5840), 957-961.
- Clausen, T., Southan, C., & Ehrmann, M. (2002). The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell*, 10(3), 443-55.
- Cline, K., & McCaffery, M. (2007). Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery. *EMBO J*, 26(13), 3039-49.
- Cline, K., & Mori, H. (2001). Thylakoid Δ pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *Journal of Cell Biology*, 154(4), 719-730.
- Collin, S., Guilvout, I., Chami, M., & Pugsley, A. (2007). YaeT-independent multimerization and outer membrane association of secretin PulD. *Mol Microbiol*, 64(5), 1350-7.
- Collin, S., Guilvout, I., Nickerson, N., & Pugsley, A. (2011). Sorting of an integral outer membrane protein via the lipoprotein-specific Lol pathway and a dedicated lipoprotein pilotin. *Mol Microbiol*, 80(3), 655-65.
- Collins, R. F., Davidsen, L., Derrick, J. P., Ford, R. C., & Tonjum, T. (2001). Analysis of the PilQ Secretin from *Neisseria meningitidis* by Transmission Electron Microscopy Reveals a Dodecameric Quaternary Structure. *Journal of Bacteriology*, 183(13), 3825-3832.
- Condemine, G., & Shevchik, V. E. (2000). Overproduction of the secretin OutD suppresses the secretion defect of an *Erwinia chrysanthemi* outB mutant. *Microbiology*, 146(3), 639-647.
- Cooper, V., & Salmond, G. (1993). Molecular analysis of the major cellulase (CelV) of *Erwinia carotovora*: evidence for an evolutionary « mix-and-match » of enzyme domains. *Mol Gen Genet*, 241(3-4), 341-50.
- Cornelis, G. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol*, 4(11), 811-25.
- Cota-Gomez, A., Vasil, A., Kadurugamuwa, J., Beveridge, T., Schweizer, H., & Vasil, M. (1997). PlcR1 and PlcR2 are putative calcium-binding proteins required for secretion of the hemolytic phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 65(7), 2904-2913.
- Cotter, S. E., Surana, N. K., Grass, S., & St. Geme, J. W., III. (2006). Trimeric Autotransporters Require Trimerization of the Passenger Domain for Stability and Adhesive Activity. *Journal of Bacteriology*, 188(15), 5400-5407.
- Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Loch, C., & Jacob-Dubuisson, F. (2001). Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *The EMBO Journal*, 20(18), 5040-5048.
- Craig, L., & Li, J. (2008). Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr Opin Struct Biol*, 18(2), 267-77.
- Craig, L., Taylor, R., Pique, M., Adair, B., Arvai, A., Singh, M., Tainer, J. (2003). Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin. *Mol Cell*, 11(5), 1139-50.
- Craig, L., Volkmann, N., Arvai, A., Pique, M., Yeager, M., Egelman, E., & Tainer, J. (2006). Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Mol Cell*, 23(5), 651-62.

- Crane, J., Suo, Y., Lilly, A., Mao, C., Hubbell, W., & Randall, L. (2006). Sites of interaction of a precursor polypeptide on the export chaperone SecB mapped by site-directed spin labeling. *J Mol Biol*, 363(1), 63-74.
- Creze, C., Castang, S., Derivery, E., Haser, R., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Shevchik, V. E., & Gouet, P. (2008). The Crystal Structure of Pectate Lyase PelI from Soft Rot Pathogen *Erwinia chrysanthemi* in Complex with Its Substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 283(26), 18260-18268.
- Cristobal, S., de Gier, J., Nielsen, H., & von Heijne, G. (1999). Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 18(11), 2982-90.
- Cross, B., Sinning, I., Luirink, J., & High, S. (2009). Delivering proteins for export from the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(4), 255-64.
- Cubillos-Rojas, M., Amair-Pinedo, F., Tato, I., Bartrons, R., Ventura, F., Rosa, J.L. (2010) Simultaneous electrophoretic analysis of proteins of very high and low molecular mass using Tris-acetate polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 31, 1318-1321.
- D'Enfert, C., Ryter, A., & Pugsley, A. (1987). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO J*, 6(11), 3531-8.
- Dabney-Smith, C., & Cline, K. (2009). Clustering of C-Terminal Stromal Domains of Tha4 Homooligomers during Translocation by the Tat Protein Transport System. *Molecular Biology of the Cell*, 20(7), 2060-2069.
- Dabney-Smith, C., Mori, H., & Cline, K. (2006). Oligomers of Tha4 Organize at the Thylakoid Tat Translocase during Protein Transport. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5476-5483. doi:10.1074/jbc.M512453200
- Dalbey, R., Wang, P., & Kuhn, A. (2011). Assembly of bacterial inner membrane proteins. *Annu Rev Biochem*, 80, 161-87.
- Das, S., & Oliver, D. B. (2011). Mapping of the SecA/SecY and SecA/SecE Interfaces by Site-directed in Vivo Photocross-linking. *Journal of Biological Chemistry*, 286(14), 12371-12380.
- De Buck, E., Lammertyn, E., & Anne, J. (2008). The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence. *Trends Microbiol*, 16(9), 442-53.
- De Gier, J., & Luirink, J. (2003). The ribosome and YidC. New insights into the biogenesis of *Escherichia coli* inner membrane proteins. *EMBO Rep*, 4(10), 939-43.
- De Groot, A., Filloux, A., & Tommassen, J. (1991). Conservation of *xcp* genes, involved in the two-step protein secretion process, in different *Pseudomonas* species and other gram-negative bacteria. *Mol Gen Genet*, 229(2), 278-84.
- De Groot, A., Koster, M., Gerard-Vincent, M., Gerritse, G., Lazdunski, A., Tommassen, J., & Filloux, A. (2001). Exchange of Xcp (Gsp) Secretion Machineries between *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas alcaligenes*: Species Specificity Unrelated to Substrate Recognition. *Journal of Bacteriology*, 183(3), 959-967.
- De la Cruz, F., Frost, L., Meyer, R., & Zechner, E. (2010). Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 34(1), 18-40.
- Debarbieux, L., & Wandersman, C. (2001). Folded HasA inhibits its own secretion through its ABC exporter. *EMBO J*, 20(17), 4657-63.
- Delepelaire, P. (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1694(1-3), 149-61.
- Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U., & Cornelis, G. (2010). Deciphering the assembly of the Yersinia type III secretion injectisome. *EMBO J*, 29(11), 1928-40.
- Dilks, K., Rose, R. W., Hartmann, E., & Pohlschroder, M. (2003). Prokaryotic Utilization of the Twin-Arginine Translocation Pathway: a Genomic Survey. *Journal of Bacteriology*, 185(4), 1478-1483.

- Douet, V., Loiseau, L., Barras, F., & Py, B. (2004). Systematic analysis, by the yeast two-hybrid, of protein interaction between components of the type II secretory machinery of *Erwinia chrysanthemi*. *Res Microbiol*, 155(2), 71-5.
- Douzi, B., Ball, G., Cambillau, C., Tegoni, M., & Voulhoux, R. (2011). Deciphering the Xcp *Pseudomonas aeruginosa* Type II Secretion Machinery through Multiple Interactions with Substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 286(47), 40792-40801.
- Douzi, B., Durand, E., Bernard, C., Alphonse, S., Cambillau, C., Filloux, A., Voulhoux, R. (2009). The XcpV/GspI Pseudopilin Has a Central Role in the Assembly of a Quaternary Complex within the T2SS Pseudopilus. *Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 34580-34589.
- Douzi, B., Filloux, A., & Voulhoux, R. (2012). On the path to uncover the bacterial type II secretion system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1592), 1059-1072.
- Doyle, D., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., & MacKinnon, R. (1996). Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell*, 85(7), 1067-76.
- Du Plessis, D., Nouwen, N., & Driessen, A. (2011). The Sec translocase. *Biochim Biophys Acta*, 1808(3), 851-65.
- Dunstan, R. A., Heinz, E., Wijeyewickrema, L. C., Pike, R. N., Purcell, A. W., Evans, T. J., ... Lithgow, T. (2013). Assembly of the type II secretion system such as found in *Vibrio cholerae* depends on the novel Pilotin AspS. *PLoS Pathogens*, 9(1), e1003117.
- Duong, F. (2003). Binding, activation and dissociation of the dimeric SecA ATPase at the dimeric SecYEG translocase. *EMBO J*, 22(17), 4375-84.
- Duong, F., Lazdunski, A., & Murgier, M. (1996). Protein secretion by heterologous bacterial ABC-transporters: the C-terminus secretion signal of the secreted protein confers high recognition specificity. *Mol Microbiol*, 21(3), 459-70.
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzo, D., Peduzzi, J., & Rebuffat, S. (2007). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep*, 24(4), 708-34.
- Durand, E., Alphonse, S., Brochier-Armanet, C., Ball, G., Douzi, B., Durand, E., Voulhoux, R. (2011). The Assembly Mode of the Pseudopilus: A HALLMARK TO DISTINGUISH A NOVEL SECRETION SYSTEM SUBTYPE. *Journal of Biological Chemistry*, 286(27), 24407-24416.
- Durand, E., Bernadac, A., Ball, G., Lazdunski, A., Sturgis, J. N., & Filloux, A. (2003). Type II Protein Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the Pseudopilus Is a Multifibrillar and Adhesive Structure. *Journal of Bacteriology*, 185(9), 2749-2758.
- Durand, E., Michel, G., Voulhoux, R., Kurner, J., Bernadac, A., & Filloux, A. (2005). XcpX Controls Biogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT-containing Pseudopilus. *Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31378-31389.
- Durand, E., Verger, D., Rego, A., Chandran, V., Meng, G., Fronzes, R., & Waksman, G. (2009). Structural biology of bacterial secretion systems in gram-negative pathogens--potential for new drug targets. *Infect Disord Drug Targets*, 9(5), 518-47.
- Dutta, P. R., Sui, B. Q., & Nataro, J. P. (2003). Structure-function analysis of the enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin autotransporter using scanning linker mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 39912-39920.
- Eidam, O., Dworkowski, F., Glockshuber, R., Grutter, M., & Capitani, G. (2008). Crystal structure of the ternary FimC-FimF(t)-FimD(N) complex indicates conserved pilus chaperone-subunit complex recognition by the usher FimD. *FEBS Lett*, 582(5), 651-5.
- Emsley, P., Charles, I. G., Fairweather, N. F., & Isaacs, N. W. (1996). Structure of Bordetella pertussis virulence factor P.69 pertactin. *Nature*, 381(6577), 90-92.
- Facey, S., & Kuhn, A. (2010). Biogenesis of bacterial inner-membrane proteins. *Cell Mol Life Sci*, 67(14), 2343-62.

- Fan, E., Fiedler, S., Jacob-Dubuisson, F., & Müller, M. (2012). Two-partner secretion of gram-negative bacteria: a single β -barrel protein enables transport across the outer membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(4), 2591-2599.
- Fekkes, P., van der Does, C., & Driessen, A. (1997). The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J*, 16(20), 6105-13.
- Ferrandez, Y., & Condemine, G. (2008a). Novel mechanism of outer membrane targeting of proteins in Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol*, 69(6), 1349-57.
- Filloux, A. (2004). The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta*, 1694(1-3), 163-79.
- Filloux, A. (2009). The type VI secretion system: a tubular story. *EMBO J*, 28(4), 309-10.
- Filloux, A. (2010a). A Variety of Bacterial Pili Involved in Horizontal Gene Transfer. *Journal of Bacteriology*, 192(13), 3243-3245.
- Filloux, A. (2010b). Secretion Signal and Protein Targeting in Bacteria: a Biological Puzzle. *Journal of Bacteriology*, 192(15), 3847-3849.
- Francetic, O., Buddelmeijer, N., Lewenza, S., Kumamoto, C. A., & Pugsley, A. P. (2007). Signal Recognition Particle-Dependent Inner Membrane Targeting of the PulG Pseudopilin Component of a Type II Secretion System. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 1783-1793.
- Francetic, O., & Pugsley, A. P. (2005). Towards the Identification of Type II Secretion Signals in a Nonacylated Variant of Pullulanase from *Klebsiella oxytoca*. *Journal of Bacteriology*, 187(20), 7045-7055.
- Franz, L., Douzi, B., Durand, E., Dyer, D., Voulhoux, R., & Forest, K. (2011). Structure of the minor pseudopilin XcpW from the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion system. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 67(Pt 2), 124-30.
- Frenken, L., Bos, J., Visser, C., Muller, W., Tommassen, J., & Verrips, C. (1993). An accessory gene, *lipB*, required for the production of active *Pseudomonas glumae* lipase. *Mol Microbiol*, 9(3), 579-89.
- Frenken, L., de Groot, A., Tommassen, J., & Verrips, C. (1993). Role of the *lipB* gene product in the folding of the secreted lipase of *Pseudomonas glumae*. *Mol Microbiol*, 9(3), 591-9.
- Fritsch, M. J., Trunk, K., Alcoforado Diniz, J., Guo, M., Trost, M., & Coulthurst, S. J. (2013). Proteomic identification of novel secreted anti-bacterial toxins of the *Serratia marcescens* Type VI secretion system. *Molecular and Cellular Proteomics*,
- Fronzes, R., Remaut, H., & Waksman, G. (2008). Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J*, 27(17), 2271-80.
- Fronzes, R., Schafer, E., Wang, L., Saibil, H. R., Orlova, E. V., & Waksman, G. (2009). Structure of a Type IV Secretion System Core Complex. *Science*, 323(5911), 266-268.
- Genin, S., & Boucher, C. (1994). A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain. *Mol Gen Genet*, 243(1), 112-8.
- Gerard, F., & Cline, K. (2006). Efficient Twin Arginine Translocation (Tat) Pathway Transport of a Precursor Protein Covalently Anchored to Its Initial cpTatC Binding Site. *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), 6130-6135.
- Gerard, F., & Cline, K. (2007). The Thylakoid Proton Gradient Promotes an Advanced Stage of Signal Peptide Binding Deep within the Tat Pathway Receptor Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5263-5272.
- Gerritse, G., Hommes, R. W. J., & Quax, W. J. (1998). Development of a Lipase Fermentation Process That Uses a Recombinant *Pseudomonas alcaligenes* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2644-2651.

- Ghigo, J., & Wandersman, C. (1994). A carboxyl-terminal four-amino acid motif is required for secretion of the metalloprotease PrtG through the *Erwinia chrysanthemi* protease secretion pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 269(12), 8979-8985.
- Gilson, L., Mahanty, H. K., & Kolter, R. (1987). Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *Journal of Bacteriology*, 169(6), 2466-2470.
- Giltner, C. L., Nguyen, Y., & Burrows, L. L. (2012). Type IV Pilin Proteins: Versatile Molecular Modules. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 740-772.
- Gohlke, U., Pullan, L., McDevitt, C. A., Porcelli, I., de Leeuw, E., Palmer, T., Berks, B. C. (2005). The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 102(30), 10482-10486.
- Golovanov, A., Balasingham, S., Tzitzilonis, C., Goult, B., Lian, L., Homberset, H., Derrick, J. (2006). The solution structure of a domain from the *Neisseria meningitidis* lipoprotein PilP reveals a new beta-sandwich fold. *J Mol Biol*, 364(2), 186-95.
- Gomis-Ruth, F., Moncalian, G., Perez-Luque, R., Gonzalez, A., Cabezon, E., de la Cruz, F., & Coll, M. (2001). The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature*, 409(6820), 637-41.
- Gorla, P., Pandey, J. P., Parthasarathy, S., Merrick, M., & Siddavattam, D. (2009). Organophosphate Hydrolase in *Brevundimonas diminuta* Is Targeted to the Periplasmic Face of the Inner Membrane by the Twin Arginine Translocation Pathway. *Journal of Bacteriology*, 191(20), 6292-6299.
- Gouffi, K., Gerard, F., Santini, C.L., & Wu, L.F. (2004). Dual Topology of the *Escherichia coli* TatA Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11608-11615.
- Grant, SG., Jessee, J., Bloom, FR., & Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 87: 4645 - 4649.
- Grass, S., & St Geme, J. W., 3rd. (2000). Maturation and secretion of the non-typable *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin: roles of the N-terminal and C-terminal domains. *Molecular Microbiology*, 36(1), 55-67.
- Gray, M., Bagdasarian, M., Hol, W., & Sandkvist, M. (2011). *In vivo* cross-linking of EpsG to EpsL suggests a role for EpsL as an ATPase-pseudopilin coupling protein in the Type II secretion system of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, 79(3), 786-98.
- Grohmann, E., Muth, G., & Espinosa, M. (2003). Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(2), 277-301.
- Gu, S., Kelly, G., Wang, X., Frenkiel, T., Shevchik, V. E., & Pickersgill, R. W. (2012). Solution structure of homology region (HR) domain of type II secretion system. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(12), 9072-9080.
- Gu, S., Rehman, S., Wang, X., Shevchik, V. E., & Pickersgill, R. W. (2012). Structural and functional insights into the pilotin-secretin complex of the type II secretion system. *PLoS Pathogens*, 8(2),
- Guglielmini, J., de la Cruz, F., & Rocha, E. P. C. (2013). Evolution of Conjugation and Type IV Secretion Systems. *Molecular Biology and Evolution*, 30(2), 315-331.
- Guilvout, I., Chami, M., Engel, A., Pugsley, A., & Bayan, N. (2006). Bacterial outer membrane secretin PulD assembles and inserts into the inner membrane in the absence of its pilotin. *EMBO J*, 25(22), 5241-9.
- Guilvout, I., Hardie, K. R., Sauvonnet, N., & Pugsley, A. P. (1999). Genetic Dissection of the Outer Membrane Secretin PulD: Are There Distinct Domains for Multimerization and Secretion Specificity? *Journal of Bacteriology*, 181(23), 7212-7220.
- Guilvout, I., Nickerson, N., Chami, M., & Pugsley, A. (2011). Multimerization-defective variants of dodecameric secretin PulD. *Res Microbiol*, 162(2), 180-90.

- Hachani, A., Lossi, N. S., Hamilton, A., Jones, C., Bleves, S., Albesa-Jove, D., & Filloux, A. (2011). Type VI Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*: SECRETION AND MULTIMERIZATION OF VgrG PROTEINS. *Journal of Biological Chemistry*, 286(14), 12317-12327.
- Halic, M., Blau, M., Becker, T., Mielke, T., Pool, M., Wild, K., Beckmann, R. (2006). Following the signal sequence from ribosomal tunnel exit to signal recognition particle. *Nature*, 444(7118), 507-11.
- Halic, M., Gartmann, M., Schlenker, O., Mielke, T., Pool, M. R., Sinning, I., & Beckmann, R. (2006). Signal Recognition Particle Receptor Exposes the Ribosomal Translocon Binding Site. *Science*, 312(5774), 745-747.
- Hardie, K., Lory, S., & Pugsley, A. (1996). Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J*, 15(5), 978-88.
- Harris, B. Z., & Lim, W. A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *Journal of Cell Science*, 114(18), 3219-3231.
- Havarstein, L., Diep, D., & Nes, I. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol*, 16(2), 229-40.
- Hayes, C. S., Aoki, S. K., & Low, D. A. (2010). Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annual Review of Genetics*, 44, 71-90.
- Hazes, B., & Frost, L. (2008). Towards a systems biology approach to study type II/IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta*, 1778(9), 1839-50.
- Henderson, I. R., & Nataro, J. P. (2001). Virulence Functions of Autotransporter Proteins. *Infection and Immunity*, 69(3), 1231-1243.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., & Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68(4), 692-744.
- Hillier, B. J., Christopherson, K. S., Prehoda, K. E., Bredt, D. S., & Lim, W. A. (1999). Unexpected Modes of PDZ Domain Scaffolding Revealed by Structure of nNOS-Syntrophin Complex. *Science*, 284(5415), 812-815.
- Hirst, T. R., & Holmgren, J. (1987). Conformation of protein secreted across bacterial outer membranes: a study of enterotoxin translocation from *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 84(21), 7418-7422.
- Hodak, H., Clantin, B., Willery, E., Villeret, V., Locht, C., & Jacob-Dubuisson, F. (2006). Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol Microbiol*, 61(2), 368-82.
- Hodak, H., & Jacob-Dubuisson, F. (2007). Current challenges in autotransport and two-partner protein secretion pathways. *Res Microbiol*, 158(8-9), 631-7.
- Hohlfeld, S., Pattis, I., Puls, J., Plano, G., Haas, R., & Fischer, W. (2006). A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Mol Microbiol*, 59(5), 1624-37.
- Holland, I., Schmitt, L., & Young, J. (2005). Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol*, 22(1-2), 29-39.
- Homma, T., Yoshihisa, T., & Ito, K. (1997). Subunit interactions in the *Escherichia coli* protein translocase: SecE and SecG associate independently with SecY. *FEBS Lett*, 408(1), 11-5.
- Hormaeche, I., Segura, R., Vecino, A., Goni, F., de la Cruz, F., & Alkorta, I. (2006). The transmembrane domain provides nucleotide binding specificity to the bacterial conjugation protein TrwB. *FEBS Lett*, 580(13), 3075-82.
- Howard, S., Gebhart, C., Langen, G., Li, G., & Strozen, T. (2006). Interactions between peptidoglycan and the ExeAB complex during assembly of the type II secretin of *Aeromonas hydrophila*. *Mol Microbiol*, 59(3), 1062-72.

- Howard, S., Meiklejohn, H., Shivak, D., & Jahagirdar, R. (1996). A TonB-like protein and a novel membrane protein containing an ATP-binding cassette function together in exotoxin secretion. *Mol Microbiol*, 22(4), 595-604.
- Hu, J., Xue, Y., Lee, S., & Ha, Y. (2011). The crystal structure of GXGD membrane protease FlaK. *Nature*, 475(7357), 528-31.
- Hu, N., Leu, W., Lee, M., Chen, A., Chen, S., Song, Y., & Chen, L. (2002). XpsG, the major pseudopilin in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a pilus-like structure between cytoplasmic and outer membranes. *Biochem J*, 365(Pt 1), 205-11.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Shevchik V.E. (2014) Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environ Microbiol Rep*. doi:10.1111/1758-2229.12166.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., & Robert-Baudouy J. (1987). Hexuronate catabolism in *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology*. 169:1223- 1231.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Shevchik, V. E., & Nasser, W. (2002). PehN, a Polygalacturonase Homologue with a Low Hydrolase Activity, Is Coregulated with the Other *Erwinia chrysanthemi* Polygalacturonases. *Journal of Bacteriology*, 184(10), 2664-2673.
- Hunt, J. F., Weinkauf, S., Henry, L., Fak, J. J., McNicholas, P., Oliver, D. B., & Deisenhofer, J. (2002). Nucleotide Control of Interdomain Interactions in the Conformational Reaction Cycle of SecA. *Science*, 297(5589).
- Ieva, R., Tian, P., Peterson, J. H., & Bernstein, H. D. (2011). Sequential and spatially restricted interactions of assembly factors with an autotransporter beta domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), E383-391.
- Ishii, S., Yano, T., Ebihara, A., Okamoto, A., Manzoku, M., & Hayashi, H. (2010). Crystal Structure of the Peptidase Domain of Streptococcus ComA, a Bifunctional ATP-binding Cassette Transporter Involved in the Quorum-sensing Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 285(14), 10777-10785.
- Iwanczyk, J., Damjanovic, D., Kooistra, J., Leong, V., Jomaa, A., Ghirlando, R., & Ortega, J. (2007). Role of the PDZ Domains in *Escherichia coli* DegP Protein. *Journal of Bacteriology*, 189(8),
- Izoré, T., Perdu, C., Job, V., Attree, I., Faudry, E., & Dessen, A. (2011). Structural characterization and membrane localization of ExsB from the type III secretion system (T3SS) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Biology*, 413(1), 236-246.
- Jacob-Dubuisson, F., Buisine, C., Mielcarek, N., Clément, E., Menozzi, F. D., & Loch, C. (1996). Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Molecular Microbiology*, 19(1), 65-78.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R., & Coutte, L. (2004). Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta*, 1694(1-3), 235-57.
- Jacob-Dubuisson, F., Guérin, J., Baelen, S., & Clantin, B. (2013). Two-partner secretion: as simple as it sounds? *Research in Microbiology*, 164(6), 583-595.
- Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., Clantin, B., Delattre, A.-S., & Saint, N. (2009). First structural insights into the TpsB/Omp85 superfamily. *Biological Chemistry*, 390(8), 675-684.
- Jakubowski, S., Kerr, J., Garza, I., Krishnamoorthy, V., Bayliss, R., Waksman, G., & Christie, P. (2009). Agrobacterium VirB10 domain requirements for type IV secretion and T pilus biogenesis. *Mol Microbiol*, 71(3), 779-94.
- Jenkins, J., Mayans, O., Smith, D., Worboys, K., & Pickersgill, R. (2001). Three-dimensional structure of *Erwinia chrysanthemi* pectin methylesterase reveals a novel esterase active site. *J Mol Biol*, 305(4), 951-60.
- Jenkins, J., Shevchik, V. E., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., & Pickersgill, R. W. (2004). The Crystal Structure of Pectate Lyase Pel9A from *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9139-9145.
- Jeziorowski, A., & Gordon, D. M. (2007). Evolution of Microcin V and Colicin Ia Plasmids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189(19), 7045-7052.

- Jha, G., Rajeshwari, R., & Sonti, R. (2005). Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact*, 18(9), 891-8.
- Jiang, B., & Howard, S. (1992). The *Aeromonas hydrophila* *exeE* gene, required both for protein secretion and normal outer membrane biogenesis, is a member of a general secretion pathway. *Mol Microbiol*, 6(10), 1351-61.
- Jobichen, C., Chakraborty, S., Li, M., Zheng, J., Joseph, L., Mok, Y.-K., Sivaraman, J. (2010). Structural basis for the secretion of EvpC: a key type VI secretion system protein from *Edwardsiella tarda*. *PloS One*, 5(9), e12910.
- Johnson, T. A., Qiu, J., Plaut, A. G., & Holyoak, T. (2009). Active-site gating regulates substrate selectivity in a chymotrypsin-like serine protease the structure of haemophilus influenzae immunoglobulin A1 protease. *Journal of Molecular Biology*, 389(3), 559-574.
- Jomaa, A., Damjanovic, D., Leong, V., Ghirlando, R., Iwanczyk, J., & Ortega, J. (2007). The Inner Cavity of *Escherichia coli* DegP Protein Is Not Essential for Molecular Chaperone and Proteolytic Activity. *Journal of Bacteriology*, 189(3), 706-716.
- Jong, W., ten Hagen-Jongman, C., den Blaauwen, T., Slotboom, D., Tame, J., Wickstrom, D., Luirink, J. (2007). Limited tolerance towards folded elements during secretion of the autotransporter Hbp. *Mol Microbiol*, 63(5), 1524-36.
- Joshi, M., Mann, S., Antelmann, H., Widdick, D., Fyans, J., Chandra, G., Palmer, T. (2010). The twin arginine protein transport pathway exports multiple virulence proteins in the plant pathogen *Streptomyces scabies*. *Mol Microbiol*, 77(1), 252-71.
- Kagami, Y., Ratliff, M., Surber, M., Martinez, A., & Nunn, D. (1998). Type II protein secretion by *Pseudomonas aeruginosa*: genetic suppression of a conditional mutation in the pilin-like component XcpT by the cytoplasmic component XcpR. *Mol Microbiol*, 27(1), 221-33.
- Kajava, A., & Steven, A. (2006). The turn of the screw: variations of the abundant beta-solenoid motif in passenger domains of Type V secretory proteins. *J Struct Biol*, 155(2), 306-15.
- Kanamaru, S. (2009). Structural similarity of tailed phages and pathogenic bacterial secretion systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 106(11), 4067-4068.
- Kanonenberg, K., Schwarz, C. K. W., & Schmitt, L. (2013). Type I secretion systems - a story of appendices. *Research in Microbiology*, 164(6), 596-604.
- Kapitein, N., & Mogk, A. (2013). Deadly syringes: type VI secretion system activities in pathogenicity and interbacterial competition. *Current Opinion in Microbiology*, 16(1), 52-58.
- Karuppiah, V., & Derrick, J. P. (2011). Structure of the PilM-PilN Inner Membrane Type IV Pilus Biogenesis Complex from *Thermus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(27), 24434-24442.
- Kazemi-Pour, N., Condemine, G., & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2004). The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics*, 4(10), 3177-86.
- Kazmierczak, B. I., Mielke, D. L., Russel, M., & Model, P. (1994). pIV, a filamentous phage protein that mediates phage export across the bacterial cell envelope, forms a multimer. *Journal of Molecular Biology*, 238(2), 187-198.
- Keramisanou, D., Biris, N., Gelis, I., Sianidis, G., Karamanou, S., Economou, A., & Kalodimos, C. (2006). Disorder-order folding transitions underlie catalysis in the helicase motor of SecA. *Nat Struct Mol Biol*, 13(7), 594-602.
- Kihara, A., Akiyama, Y., & Ito, K. (1995). FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 92(10), 4532-4536.
- Kim, D., & Kim, K. (2005). Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. *J Biochem Mol Biol*, 38(3), 266-74.
- Kirn, T., Bose, N., & Taylor, R. (2003). Secretion of a soluble colonization factor by the TCP type 4 pilus biogenesis pathway in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, 49(1), 81-92.

- Koebnik, R., Locher, K., & Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol*, 37(2), 239-53.
- Kohler, R., Schafer, K., Muller, S., Vignon, G., Diederichs, K., Philippsen, A., Welte, W. (2004). Structure and assembly of the pseudopilin PulG. *Mol Microbiol*, 54(3), 647-64.
- Kol, S., Majczak, W., Heerlien, R., van der Berg, J., Nouwen, N., & Driessen, A. (2009). Subunit a of the F(1)F(0) ATP synthase requires YidC and SecYEG for membrane insertion. *J Mol Biol*, 390(5), 893-901.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., & Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 405(6789), 914-919.
- Korotkov, K., Gonen, T., & Hol, W. (2011). Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes. *Trends Biochem Sci*, 36(8), 433-43.
- Korotkov, K., & Hol, W. (2008). Structure of the GspK-GspI-GspJ complex from the enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system. *Nat Struct Mol Biol*, 15(5), 462-8.
- Korotkov, K., Pardon, E., Steyaert, J., & Hol, W. (2009). Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody. *Structure*, 17(2), 255-65.
- Korotkov, K., Sandkvist, M., & Hol, W. (2012). The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol*, 10(5), 336-51.
- Korotkov, K. V., Delarosa, J. R., & Hol, W. G. J. (2013). A dodecameric ring-like structure of the N0 domain of the type II secretin from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Structural Biology*, 183(3), 354-362.
- Korotkov, K. V., Gray, M. D., Kreger, A., Turley, S., Sandkvist, M., & Hol, W. G. J. (2009). Calcium Is Essential for the Major Pseudopilin in the Type 2 Secretion System. *Journal of Biological Chemistry*, 284(38), 25466-25470.
- Korotkov, K. V., & Hol, W. G. J. (2013). Crystal structure of the pilotin from the enterohemorrhagic *Escherichia coli* type II secretion system. *Journal of Structural Biology*, 182(2), 186-191.
- Korotkov, K. V., Krumm, B., Bagdasarian, M., & Hol, W. G. J. (2006). Structural and functional studies of EpsC, a crucial component of the type 2 secretion system from *Vibrio cholerae*. *Journal of Molecular Biology*, 363(2), 311-321.
- Kostecki, J., Li, H., Turner, R., & DeLisa, M. (2010). Visualizing interactions along the *Escherichia coli* twin-arginine translocation pathway using protein fragment complementation. *PLoS One*, 5(2), e9225.
- Kowal, J.I., Chami, M., Ringler, P., Müller, S.A., Kudryashev, M., Castaño-Díez, D., Amstutz, M., Cornelis, G.R., Stahlberg, H., Engel, A. (2013) Structure of the dodecameric *Yersinia enterocolitica* secretin YscC and its trypsin-resistant core. *Structure*. 3(12), 2152-61.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 305(3), 567-80.
- Kuhn, A., Stuart, R., Henry, R., & Dalbey, R. (2003). The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol*, 13(10), 510-6.
- Kühnel, K., & Diezmann, D. (2011). Crystal structure of the autochaperone region from the *Shigella flexneri* autotransporter IcsA. *Journal of Bacteriology*, 193(8), 2042-2045.
- Kusters, I., & Driessen, A. (2011). SecA, a remarkable nanomachine. *Cell Mol Life Sci*, 68(12), 2053-66.
- Kwan, D., Thomas, J., & Bolhuis, A. (2008). Bioenergetic requirements of a Tat-dependent substrate in the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *FEBS J*, 275(24), 6159-67.
- Laatu, M., & Condemine, G. (2003). Rhamnogalacturonate Lyase RhiE Is Secreted by the Out System in *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1642-1649.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lang, S., Gruber, K., Mihajlovic, S., Arnold, R., Gruber, C., Steinlechner, S., Zechner, E. (2010). Molecular recognition determinants for type IV secretion of diverse families of conjugative relaxases. *Mol Microbiol*, 78(6), 1539-55.

- LaPointe, C. F., & Taylor, R. K. (2000). The Type 4 Prepilin Peptidases Comprise a Novel Family of Aspartic Acid Proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 1502-1510.
- Laurent, F., Kotoujansky, A., Labesse, G., & Bertheau, Y. (1993). Characterization and overexpression of the *pem* gene encoding pectin methylesterase of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Gene*, 131(1), 17-25.
- Leake, M. C., Greene, N. P., Godun, R. M., Granjon, T., Buchanan, G., Chen, S., Berks, B. C. (2008). Variable stoichiometry of the TatA component of the twin-arginine protein transport system observed by in vivo single-molecule imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 105(40), 15376-15381.
- Lecher, J., Schwarz, C., Stoldt, M., Smits, S., Willbold, D., & Schmitt, L. (2012). An RTX Transporter Tethers Its Unfolded Substrate during Secretion via a Unique N-Terminal Domain. *Structure*, 20(10), 1778-87.
- Lee, H.M., Chen, J.R., Lee, H.L., Leu, W.M., Chen, L.Y., & Hu, N.T. (2004). Functional Dissection of the XpsN (GspC) Protein of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Type II Secretion Machinery. *Journal of Bacteriology*, 186(10), 2946-2955.
- Lee, P. A., Buchanan, G., Stanley, N. R., Berks, B. C., & Palmer, T. (2002). Truncation Analysis of TatA and TatB Defines the Minimal Functional Units Required for Protein Translocation. *Journal of Bacteriology*, 184(21), 5871-5879.
- Lee, S., & Galan, J. (2004). *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol*, 51(2), 483-95.
- Leiman, P. G., Basler, M., Ramagopal, U. A., Bonanno, J. B., Sauder, J. M., Pukatzki, S., Mekalanos, J. J. (2009). Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 106(11), 4154-4159.
- Leo, J. C., Grin, I., & Linke, D. (2012). Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 367(1592), 1088-1101.
- Li, G., & Howard, S. (2010). ExeA binds to peptidoglycan and forms a multimer for assembly of the type II secretion apparatus in *Aeromonas hydrophila*. *Mol Microbiol*, 76(3), 772-81.
- Lieberman, J. A., Frost, N. A., Hoppert, M., Fernandes, P. J., Vogt, S. L., Raivio, T. L., Donnenberg, M. S. (2012). Outer membrane targeting, ultrastructure, and single molecule localization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type IV pilus secretin BfpB. *Journal of Bacteriology*, 194(7), 1646-1658.
- Liebeton, K., Zacharias, A., & Jaeger, K.-E. (2001). Disulfide Bond in *Pseudomonas aeruginosa* Lipase Stabilizes the Structure but Is Not Required for Interaction with Its Foldase. *Journal of Bacteriology*, 183(2), 597-603.
- Lietzke, S. E., Scavetta, R. D., Yoder, M. D., & Jurnak, F. (1996). The Refined Three-Dimensional Structure of Pectate Lyase E from *Erwinia chrysanthemi* at 2.2 Å Resolution. *Plant Physiology*, 111(1), 73-92.
- Lin, J.S., Ma, L.S., & Lai, E.M. (2013) Systematic dissection of the *Agrobacterium* Type VI secretion system reveals machinery and secreted components for subcomplex formation. *PLoS One*, 8, e67647.
- Lindeberg, M., Salmond, G., & Collmer, A. (1996). Complementation of deletion mutations in a cloned functional cluster of *Erwinia chrysanthemi* out genes with *Erwinia carotovora* out homologues reveals OutC and OutD as candidate gatekeepers of species-specific secretion of proteins via the type II pathway. *Mol Microbiol*, 20(1), 175-90.
- Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., Sebo, P. (2010). RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev*, 34(6), 1076-112.
- Locht, C., Coutte, L., & Mielcarek, N. (2011). The ins and outs of pertussis toxin. *FEBS J*, 278(23), 4668-82.

- Login, F., Fries, M., Wang, X., Pickersgill, R., & Shevchik, V. (2010). A 20-residue peptide of the inner membrane protein OutC mediates interaction with two distinct sites of the outer membrane secretin OutD and is essential for the functional type II secretion system in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol*, 76(4), 944-55.
- Lossi, N. S., Dajani, R., Freemont, P., & Filloux, A. (2011). Structure-function analysis of HsiF, a gp25-like component of the type VI secretion system, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 12), 3292-3305.
- Lu, C., Turley, S., Marionni, S. T., Park, Y.-J., Lee, K. K., Patrick, M., Hol, W. G. J. (2013). Hexamers of the type II secretion ATPase GspE from *Vibrio cholerae* with increased ATPase activity. *Structure*, 21(9), 1707-1717.
- Lu, H., & Lory, S. (1996). A specific targeting domain in mature exotoxin A is required for its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J*, 15(2), 429-36.
- Luke, I., Handford, J., Palmer, T., & Sargent, F. (2009). Proteolytic processing of *Escherichia coli* twin-arginine signal peptides by LepB. *Arch Microbiol*, 191(12), 919-25.
- Lunelli, M., Hurwitz, R., Lambers, J., & Kolbe, M. (2011). Crystal structure of PrgI-SipD: insight into a secretion competent state of the type three secretion system needle tip and its interaction with host ligands. *PLoS Pathogens*, 7(8), e1002163.
- Lunelli, M., Lokareddy, R. K., Zychlinsky, A., & Kolbe, M. (2009). IpaB-IpgC interaction defines binding motif for type III secretion translocator. *PNAS*, 106, 9661 - 9666.
- Lybarger, S. R., Johnson, T. L., Gray, M. D., Sikora, A. E., & Sandkvist, M. (2009). Docking and Assembly of the Type II Secretion Complex of *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 191(9), 3149-3161.
- Lycklama A Nijeholt, J. A., & Driessen, A. J. M. (2012). The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 367(1592), 1016-1028.
- Ma, L.-S., Lin, J.-S., & Lai, E.-M. (2009). An IcmF Family Protein, ImpLM, Is an Integral Inner Membrane Protein Interacting with ImpKL, and Its Walker A Motif Is Required for Type VI Secretion System-Mediated Hcp Secretion in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 191(13), 4316-4329.
- Mackman, N., Nicaud, J., Gray, L., & Holland, I. (1985). Identification of polypeptides required for the export of haemolysin 2001 from *E. coli*. *Mol Gen Genet*, 201(3), 529-36.
- Marrero, J., & Waldor, M. K. (2007). Determinants of Entry Exclusion within Eex and TraG Are Cytoplasmic. *Journal of Bacteriology*, 189(17), 6469-6473.
- Marsh, J. W., & Taylor, R. K. (1998). Identification of the *Vibrio cholerae* type 4 prepilin peptidase required for cholera toxin secretion and pilus formation. *Molecular Microbiology*, 29(6), 1481-1492.
- Martinez, A., Ostrovsky, P., & Nunn, D. (1999). LipC, a second lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, is LipB and Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pilus biogenesis components. *Mol Microbiol*, 34(2), 317-26.
- Masi, M., & Wandersman, C. (2010). Multiple Signals Direct the Assembly and Function of a Type I Secretion System. *Journal of Bacteriology*, 192(15), 3861-3869.
- Matteï, P.-J., Faudry, E., Job, V., Izoré, T., Attree, I., & Dessen, A. (2011). Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *The FEBS Journal*, 278(3), 414-426.
- Mattick, J. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol*, 56, 289-314.
- Maurer, C., Panahandeh, S., Jungkamp, A.-C., Moser, M., & Muller, M. (2010). TatB Functions as an Oligomeric Binding Site for Folded Tat Precursor Proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 21(23), 4151-4161.
- Mazar, J., & Cotter, P. A. (2007). New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends in Microbiology*, 15(11), 508-515.

- McVay, C., & Hamood, A. (1995). Toxin A secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the role of the first 30 amino acids of the mature toxin. *Mol Gen Genet*, 249(5), 515-25.
- Meloni, S., Rey, L., Sidler, S., Imperial, J., Ruiz-Argueso, T., & Palacios, J. (2003). The twin-arginine translocation (Tat) system is essential for Rhizobium-legume symbiosis. *Mol Microbiol*, 48(5), 1195-207.
- Meng, G., Surana, N., St Geme, J., & Waksman, G. (2006). Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *EMBO J*, 25(11), 2297-304.
- Michel, G., Bleves, S., Ball, G., Lazdunski, A., & Filloux, A. (1998). Mutual stabilization of the XcpZ and XcpY components of the secretory apparatus in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 144(12), 3379-3386.
- Mickael, C. S., Lam, P.-K. S., Berberov, E. M., Allan, B., Potter, A. A., & Koster, W. (2010). *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis *tatB* and *tatC* Mutants Are Impaired in Caco-2 Cell Invasion *In Vitro* and Show Reduced Systemic Spread in Chickens. *Infection and Immunity*, 78(8), 3493-3505.
- Misic, A., Satyshur, K., & Forest, K. (2010). *P. aeruginosa* PilT structures with and without nucleotide reveal a dynamic type IV pilus retraction motor. *J Mol Biol*, 400(5), 1011-21.
- Miyata, S. T., Bachmann, V., & Pukatzki, S. (2013). Type VI secretion system regulation as a consequence of evolutionary pressure. *The Journal of Medical Microbiology*, 62(Pt_5), 663-676.
- Moraes, T. F., Spreter, T., & Strynadka, N. C. (2008). Piecing together the type III injectisome of bacterial pathogens. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(2), 258-266.
- Mori, H., & Cline, K. (2002). A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid Δ pH/Tat translocase. *Journal of Cell Biology*, 157(2), 205-210.
- Mori, H., & Ito, K. (2006). Different modes of SecY-SecA interactions revealed by site-directed in vivo photo-cross-linking. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 103(44), 16159-16164.
- Mori, H., Shimokawa, N., Satoh, Y., & Ito, K. (2004). Mutational Analysis of Transmembrane Regions 3 and 4 of SecY, a Central Component of Protein Translocase. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 3960-3969.
- Mori, H., Sugiyama, H., Yamanaka, M., Sato, K., Tagaya, M., & Mizushima, S. (1998). Amino-Terminal Region of SecA Is Involved in the Function of SecE for Protein Translocation into *Escherichia coli* Membrane Vesicles. *Journal of Biochemistry*, 124(1), 122-129.
- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., Mekalanos, J. J. (2006). A Virulence Locus of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes a Protein Secretion Apparatus. *Science*, 312(5779), 1526-1530.
- Moustafa, I., Connaris, H., Taylor, M., Zaitsev, V., Wilson, J. C., Kiefel, M. J., Taylor, G. (2004). Sialic Acid Recognition by *Vibrio cholerae* Neuraminidase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40819-40826.
- Murphy, C. K., & Beckwith, J. (1994). Residues essential for the function of SecE, a membrane component of the *Escherichia coli* secretion apparatus, are located in a conserved cytoplasmic region. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 91(7), 2557-2561.
- Musial-Siwiek, M., Rusch, S., & Kendall, D. (2005). Probing the affinity of SecA for signal peptide in different environments. *Biochemistry*, 44(42), 13987-96.
- Nagai, H., Cambronne, E. D., Kagan, J. C., Amor, J. C., Kahn, R. A., & Roy, C. R. (2005). A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 102(3), 826-831.
- Nakashima, R., Sakurai, K., Yamasaki, S., Nishino, K., & Yamaguchi, A. (2011). Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature*, 480(7378), 565-9.
- Natale, P., Bruser, T., & Driessen, A. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1778(9), 1735-56.

- Nickerson, N. N., Tosi, T., Dessen, A., Baron, B., Raynal, B., England, P., & Pugsley, A. P. (2011). Outer Membrane Targeting of Secretin PulD Protein Relies on Disordered Domain Recognition by a Dedicated Chaperone. *Journal of Biological Chemistry*, 286(45), 38833-38843.
- Nikaido, H., & Takatsuka, Y. (2009). Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta*, 1794(5), 769-81.
- Ninio, S., Zuckman-Cholon, D., Cambronne, E., & Roy, C. (2005). The Legionella IcmS-IcmW protein complex is important for Dot/Icm-mediated protein translocation. *Mol Microbiol*, 55(3), 912-26.
- Nishiyama, K., Hanada, M., & Tokuda, H. (1994). Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *The EMBO Journal*, 13(14), 3272-3277.
- Nouwen, N., & Driessen, A. (2002). SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol Microbiol*, 44(5), 1397-405.
- Nouwen, N., Ranson, N., Saibil, H., Wolpensinger, B., Engel, A., Ghazi, A., & Pugsley, A. P. (1999). Secretin PulD: Association with pilot PulS, structure, and ion-conducting channel formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 96(14), 8173-8177.
- Nouwen, N., Stahlberg, H., Pugsley, A., & Engel, A. (2000). Domain structure of secretin PulD revealed by limited proteolysis and electron microscopy. *EMBO J*, 19(10), 2229-36.
- Nunn, D. (1999). Bacterial type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologies? *Trends Cell Biol*, 9(10), 402-8.
- Nunn, D. N., & Lory, S. (1991). Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene *pilD* is a prepilin leader peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 88(8), 3281-3285.
- O'Neal, C., Amaya, E., Jobling, M., Holmes, R., & Hol, W. (2004). Crystal structures of an intrinsically active cholera toxin mutant yield insight into the toxin activation mechanism. *Biochemistry*, 43(13), 3772-82.
- Oates, J., Barrett, C., Barnett, J., Byrne, K., Bolhuis, A., & Robinson, C. (2005). The *Escherichia coli* twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular TatA complexes and minor TatAB complex. *J Mol Biol*, 346(1), 295-305.
- Oberhettinger, P., Schütz, M., Leo, J. C., Heinz, N., Berger, J., Autenrieth, I. B., & Linke, D. (2012). Intimin and invasins export their C-terminus to the bacterial cell surface using an inverse mechanism compared to classical autotransport. *PloS One*, 7(10), e47069.
- Ochsner, U. A., Snyder, A., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (2002). Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 99(12), 8312-8317.
- Okon, M., Moraes, T., Lario, P., Creagh, A., Haynes, C., Strynadka, N., & McIntosh, L. (2008). Structural characterization of the type-III pilot-secretin complex from *Shigella flexneri*. *Structure*, 16(10), 1544-54.
- Oomen, C., van Ulsen, P., van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J., & Gros, P. (2004). Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO J*, 23(6), 1257-66.
- Opalka, N., Beckmann, R., Boisset, N., Simon, M. N., Russel, M., & Darst, S. A. (2003). Structure of the filamentous phage pIV multimer by cryo-electron microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 325(3), 461-470.
- Ortega, J., Iwanczyk, J., & Jomaa, A. (2009). *Escherichia coli* DegP: a Structure-Driven Functional Model. *Journal of Bacteriology*, 191(15), 4705-4713.
- Otto, B. R., Sijbrandi, R., Luijck, J., Oudega, B., Heddle, J. G., Mizutani, K., Tame, J. R. H. (2005). Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17339-17345.
- Paetzel, M., Dalbey, R., & Strynadka, N. (1998). Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a beta-lactam inhibitor. *Nature*, 396(6707), 186-90.

- Page, A., & Parsot, C. (2002). Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol Microbiol*, 46(1), 1-11.
- Palmer, T., & Berks, B. (2012). The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Microbiol*, 10(7), 483-96.
- Palomaki, T., Pickersgill, R., Riekk, R., Romantschuk, M., & Saarilahti, H. (2002). A putative three-dimensional targeting motif of polygalacturonase (PehA), a protein secreted through the type II (GSP) pathway in *Erwinia carotovora*. *Mol Microbiol*, 43(3), 585-96.
- Panahandeh, S., Maurer, C., Moser, M., DeLisa, M. P., & Muller, M. (2008). Following the Path of a Twin-arginine Precursor along the TatABC Translocase of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33267-33275.
- Papanikolaou, Y., Papadovasilaki, M., Ravelli, R., McCarthy, A., Cusack, S., Economou, A., & Petratos, K. (2007). Structure of dimeric SecA, the *Escherichia coli* preprotein translocase motor. *J Mol Biol*, 366(5), 1545-57.
- Papish, A. L., Ladner, C. L., & Turner, R. J. (2003). The Twin-arginine Leader-binding Protein, DmsD, Interacts with the TatB and TatC Subunits of the *Escherichia coli* Twin-arginine Translocase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 32501-32506.
- Park, E., & Rapoport, T. A. (2012). Bacterial protein translocation requires only one copy of the SecY complex in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 198(5), 881-893.
- Parker, C., & Meyer, R. (2007). The R1162 relaxase/primase contains two, type IV transport signals that require the small plasmid protein MobB. *Mol Microbiol*, 66(1), 252-61.
- Patrick, M., Korotkov, K. V., Hol, W. G. J., & Sandkvist, M. (2011). Oligomerization of EpsE Coordinates Residues from Multiple Subunits to Facilitate ATPase Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10378-10386.
- Pattis, I., Weiss, E., Laugks, R., Haas, R., & Fischer, W. (2007). The *Helicobacter pylori* CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the C-terminal secretion signal of the CagA effector protein. *Microbiology*, 153(9), 2896-2909.
- Pauwels, K., Lustig, A., Wyns, L., Tommassen, J., Savvides, S., & Van Gelder, P. (2006). Structure of a membrane-based steric chaperone in complex with its lipase substrate. *Nat Struct Mol Biol*, 13(4), 374-5.
- Peabody, C. R., Chung, Y. J., Yen, M.-R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A. P., & Saier, M. H. (2003). Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology*, 149(11), 3051-3072.
- Peek, J. A., & Taylor, R. K. (1992). Characterization of a periplasmic thiol:disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 89(13), 6210-6214.
- Pepe, C., Eklund, M., & Strom, M. (1996). Cloning of an *Aeromonas hydrophila* type IV pilus biogenesis gene cluster: complementation of pilus assembly functions and characterization of a type IV leader peptidase/N-methyltransferase required for extracellular protein secretion. *Mol Microbiol*, 19(4), 857-69.
- Pietrosiuk, A., Lenherr, E. D., Falk, S., Bonemann, G., Kopp, J., Zentgraf, H., Mogk, A. (2011). Molecular Basis for the Unique Role of the AAA+ Chaperone ClpV in Type VI Protein Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 286(34), 30010-30021.
- Pohlschroder, M., Murphy, C., & Beckwith, J. (1996). In Vivo Analyses of Interactions between SecE and SecY, Core Components of the *Escherichia coli* Protein Translocation Machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 271(33), 19908-19914.
- Pool, M. (2005). Signal recognition particles in chloroplasts, bacteria, yeast and mammals (review). *Mol Membr Biol*, 22(1-2), 3-15.

- Porcelli, I., de Leeuw, E., Wallis, R., de Kruijff, B., Wallace, B., Berks, B. (2002). Characterization and membrane assembly of the TatA component of the *Escherichia coli* twin-arginine protein transport system. *Biochemistry*, 41(46), 13690-7.
- Porter, C., Bantwal, R., Bannam, T., Rosado, C., Pearce, M., Adams, V., Rood, J. (2012). The conjugation protein TcpC from *Clostridium perfringens* is structurally related to the type IV secretion system protein VirB8 from Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol*, 83(2), 275-88.
- Pos, K. (2009). Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochim Biophys Acta*, 1794(5), 782-93.
- Possot, O. M., Vignon, G., Bomchil, N., Ebel, F., & Pugsley, A. P. (2000). Multiple Interactions between Pullulanase Secretion Components Involved in Stabilization and Cytoplasmic Membrane Association of PulE. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2142-2152.
- Possot, O., & Pugsley, A. (1994). Molecular characterization of PulE, a protein required for pullulanase secretion. *Mol Microbiol*, 12(2), 287-99.
- Pugsley, A., Francetic, O., Possot, O., Sauvonnet, N., & Hardie, K. (1997). Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria--a review. *Gene*, 192(1), 13-9.
- Pugsley, A. P. (1992). Translocation of a folded protein across the outer membrane in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 89(24), 12058-12062. doi:10.1073/pnas.89.24.12058
- Pugsley, A. P., Bayan, N., & Sauvonnet, N. (2001). Disulfide Bond Formation in Secretion Component PulK Provides a Possible Explanation for the Role of DsbA in Pullulanase Secretion. *Journal of Bacteriology*, 183(4), 1312-1319.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D., & Mekalanos, J. J. (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15508-15513.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 103(5), 1528-1533.
- Pukatzki, S., McAuley, S. B., & Miyata, S. T. (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Current Opinion in Microbiology*, 12(1), 11-17.
- Punginelli, C., Maldonado, B., Grahl, S., Jack, R., Alami, M., Schroder, J., Palmer, T. (2007). Cysteine Scanning Mutagenesis and Topological Mapping of the *Escherichia coli* Twin-Arginine Translocase TatC Component. *Journal of Bacteriology*, 189(15), 5482-5494.
- Py, B., Chippaux, M., & Barras, F. (1993). Mutagenesis of cellulase EGZ for studying the general protein secretory pathway in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol*, 7(5), 785-93.
- Py, B., Loiseau, L., & Barras, F. (1999). Assembly of the type II secretion machinery of *Erwinia chrysanthemi*: direct interaction and associated conformational change between OutE, the putative ATP-binding component and the membrane protein OutL. *J Mol Biol*, 289(3), 659-70.
- Py, B., Loiseau, L., & Barras, F. (2001). An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. *EMBO Rep*, 2(3), 244-8.
- Rajeshwari, R., Jha, G., & Sonti, R. (2005). Role of an in planta-expressed xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in promoting virulence on rice. *Mol Plant Microbe Interact*, 18(8), 830-7.
- Ramsey, M., Woodhams, K., & Dillard, J. (2011). The Gonococcal Genetic Island and Type IV Secretion in the Pathogenic *Neisseria*. *Front Microbiol*, 2, 61.
- Randall, L., & Hardy, S. (2002). SecB, one small chaperone in the complex milieu of the cell. *Cell Mol Life Sci*, 59(10), 1617-23.
- Randall, L., & Henzl, M. (2010). Direct identification of the site of binding on the chaperone SecB for the amino terminus of the translocon motor SecA. *Protein Sci*, 19(6), 1173-9.

- Randall, L. L., Topping, T. B., Hardy, S. J. S., Pavlov, M. Y., Freistroffer, D. V., & Ehrenberg, M. (1997). Binding of SecB to ribosome-bound polypeptides has the same characteristics as binding to full-length, denatured proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 94(3), 802-807.
- Rao, P., Yamada, Y., Tan, Y., & Leung, K. (2004). Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Mol Microbiol*, 53(2), 573-86.
- Records, A. (2011). The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery. *Mol Plant Microbe Interact*, 24(7), 751-7.
- Reeves, P., Douglas, P., & Salmond, G. (1994). beta-Lactamase topology probe analysis of the OutO NMePhe peptidase, and six other Out protein components of the *Erwinia carotovora* general secretion pathway apparatus. *Mol Microbiol*, 12(3), 445-57.
- Rego, A., Chandran, V., & Waksman, G. (2010). Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Biochem J*, 425(3), 475-88.
- Rehman, S., Gu, S., Shevchik, V. E., & Pickersgill, R. W. (2013). Anatomy of secretin binding to the *Dickeya dadantii* type II secretion system pilotin. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 69(Pt 8), 1381-1386.
- Reichow, S. L., Korotkov, K. V., Gonen, M., Sun, J., Delarosa, J. R., Hol, W. G. J., & Gonen, T. (2011). The binding of cholera toxin to the periplasmic vestibule of the type II secretion channel. *Channels (Austin, Tex.)*, 5(3), 215-218.
- Reichow, S. L., Korotkov, K. V., Hol, W. G. J., & Gonen, T. (2010). Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(10), 1226-1232.
- Rico, A., Garcia-Ovalle, M., Mingorance, J., & Vicente, M. (2004). Role of two essential domains of *Escherichia coli* FtsA in localization and progression of the division ring. *Mol Microbiol*, 53(5), 1359-71.
- Robert, V., Filloux, A., & Michel, G. (2005). Role of XcpP in the functionality of the *Pseudomonas aeruginosa* secreton. *Res Microbiol*, 156(8), 880-6.
- Robert, V., Hayes, F., Lazdunski, A., & Michel, G. P. F. (2002). Identification of XcpZ Domains Required for Assembly of the Secreton of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 184(6), 1779-1782.
- Robien, M., Krumm, B., Sandkvist, M., & Hol, W. (2003). Crystal structure of the extracellular protein secretion NTPase EpsE of *Vibrio cholerae*. *J Mol Biol*, 333(3), 657-74.
- Rose, I., Biukovic, G., Aderhold, P., Muller, V., Gruber, G., & Averhoff, B. (2011). Identification and characterization of a unique, zinc-containing transport ATPase essential for natural transformation in *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles*, 15(2), 191-202.
- Rossiter, A. E., Leyton, D. L., Tveen-Jensen, K., Browning, D. F., Sevastyanovich, Y., Knowles, T. J., Henderson, I. R. (2011). The essential β -barrel assembly machinery complex components BamD and BamA are required for autotransporter biogenesis. *Journal of Bacteriology*, 193(16), 4250-4253.
- Ruer, S., Ball, G., Filloux, A., & de Bentzmann, S. (2008). The « P-usher », a novel protein transporter involved in fimbrial assembly and TpsA secretion. *EMBO J*, 27(20), 2669-80.
- Ryu Y & Schultz, PG. (2006). Efficient incorporation of unnatural amino acids into proteins in *Escherichia coli*. *Nat Methods*, 3(4): 263-5.
- Sagulenko, E., Sagulenko, V., Chen, J., & Christie, P. J. (2001). Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-Pilus Assembly and Substrate Selection. *Journal of Bacteriology*, 183(20), 5813-5825.
- Sagulenko, V., Sagulenko, E., Jakubowski, S., Spudich, E., & Christie, P. J. (2001). VirB7 Lipoprotein Is Exocellular and Associates with the *Agrobacterium tumefaciens* T Pilus. *Journal of Bacteriology*, 183(12), 3642-3651.
- Salacha, R., Kovacic, F., Brochier-Armanet, C., Wilhelm, S., Tommassen, J., Filloux, A., Bleves, S. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system. *Environ Microbiol*, 12(6), 1498-512.

- Sambrook, J., & Russell, D.W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sampaleanu, L., Bonanno, J., Ayers, M., Koo, J., Tammam, S., Burley, S., Howell, P. (2009). Periplasmic domains of *Pseudomonas aeruginosa* PilN and PilO form a stable heterodimeric complex. *J Mol Biol*, 394(1), 143-59.
- Samuelson, J., Chen, M., Jiang, F., Moller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Dalbey, R. (2000). YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature*, 406(6796), 637-41.
- Sandkvist, M. (2001). Biology of type II secretion. *Mol Microbiol*, 40(2), 271-83.
- Sandkvist, M. (2001). Type II Secretion and Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 69(6), 3523-3535.
- Sandkvist, M., Bagdasarian, M., Howard, S., & DiRita, V. (1995). Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*. *EMBO J*, 14(8), 1664-73.
- Sandkvist, M., Hough, L. P., Bagdasarian, M. M., & Bagdasarian, M. (1999). Direct Interaction of the EpsL and EpsM Proteins of the General Secretion Apparatus in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 181(10), 3129-3135.
- Sapriel, G., Wandersman, C., & Delepelaire, P. (2002). The N Terminus of the HasA Protein and the SecB Chaperone Cooperate in the Efficient Targeting and Secretion of HasA via the ATP-binding Cassette Transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 6726-6732.
- Sapriel, G., Wandersman, C., & Delepelaire, P. (2003). The SecB Chaperone Is Bifunctional in *Serratia marcescens*: SecB Is Involved in the Sec Pathway and Required for HasA Secretion by the ABC Transporter. *Journal of Bacteriology*, 185(1), 80-88.
- Sato, Y., Matsumoto, G., Mori, H., & Ito, K. (2003). Nearest neighbor analysis of the SecYEG complex. 1. Identification of a SecY-SecE interface. *Biochemistry*, 42(24), 7434-41.
- Satyshur, K., Worzalla, G., Meyer, L., Heiniger, E., Aukema, K., Misic, A., & Forest, K. (2007). Crystal structures of the pilus retraction motor PilT suggest large domain movements and subunit cooperation drive motility. *Structure*, 15(3), 363-76.
- Sauve, V., Bruno, S., Berks, B. C., & Hemmings, A. M. (2007). The SoxYZ Complex Carries Sulfur Cycle Intermediates on a Peptide Swinging Arm. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32), 23194-23204.
- Sauvonnet, N., Gounon, P., & Pugsley, A. P. (2000). PpdD Type IV Pilin of *Escherichia coli* K-12 Can Be Assembled into Pili in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182(3), 848-854.
- Sauvonnet, N., Poquet, I., & Pugsley, A. (1995). Extracellular secretion of pullulanase is unaffected by minor sequence changes but is usually prevented by adding reporter proteins to its N- or C-terminal end. *Journal of Bacteriology*, 177(18), 5238-5246.
- Sauvonnet, N., & Pugsley, A. (1996). Identification of two regions of *Klebsiella oxytoca* pullulanase that together are capable of promoting beta-lactamase secretion by the general secretory pathway. *Mol Microbiol*, 22(1), 1-7.
- Sauvonnet, N., & Pugsley, A. (1998). The requirement for DsbA in pullulanase secretion is independent of disulphide bond formation in the enzyme. *Mol Microbiol*, 27(3), 661-7.
- Sauvonnet, N., Vignon, G., Pugsley, A., & Gounon, P. (2000). Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 19(10), 2221-8.
- Savvides, S., Yeo, H., Beck, M., Blaesing, F., Lurz, R., Lanka, E., Waksman, G. (2003). VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. *EMBO J*, 22(9), 1969-80.
- Schoenhofen, I. C., Li, G., Strozen, T. G., & Howard, S. P. (2005). Purification and Characterization of the N-Terminal Domain of ExeA: a Novel ATPase Involved in the Type II Secretion Pathway of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6370-6378.
- Schägger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc*, 1, 16-22.

- Schraidt, O., & Marlovits, T. C. (2011). Three-dimensional model of Salmonella's needle complex at subnanometer resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6021), 1192-1195.
- Schulein, R., Guye, P., Rhomberg, T. A., Schmid, M. C., Schroder, G., Vergunst, A. C., Dehio, C. (2005). A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 102(3), 856-861.
- Selkig, J., Mosbahi, K., Webb, C., Belousoff, M., Perry, A., Wells, T., Lithgow, T. (2012). Discovery of an archetypal protein transport system in bacterial outer membranes. *Nat Struct Mol Biol*, 19(5), 506-10.
- Seo, J., Brencic, A., & Darwin, A. J. (2009). Analysis of secretin-induced stress in *Pseudomonas aeruginosa* suggests prevention rather than response and identifies a novel protein involved in secretin function. *Journal of Bacteriology*, 191(3), 898-908.
- Senf, F., Tommassen, J., & Koster, M. (2008). Polar secretion of proteins via the Xcp type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 154(10), 3025-3032.
- Serek, J., Bauer-Manz, G., Struhalla, G., van den Berg, L., Kiefer, D., Dalbey, R., & Kuhn, A. (2004). *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO J*, 23(2), 294-301.
- Sexton, J. A., Miller, J. L., Yoneda, A., Kehl-Fie, T. E., & Vogel, J. P. (2004). *Legionella pneumophila* DotU and IcmF Are Required for Stability of the Dot/Icm Complex. *Infection and Immunity*, 72(10), 5983-5992.
- Sharma, V., Arockiasamy, A., Ronning, D. R., Savva, C. G., Holzenburg, A., Braunstein, M., Sacchettini, J. C. (2003). Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* SecA, a preprotein translocating ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 100(5), 2243-2248.
- Shevchik, V., Boccara, M., Vedel, R., & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1998). Processing of the pectate lyase PelI by extracellular proteases of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol Microbiol*, 29(6), 1459-69.
- Shevchik, V., Bortoli-German, I., Robert-Baudouy, J., Robinet, S., Barras, F., & Condemine, G. (1995). Differential effect of *dsbA* and *dsbC* mutations on extracellular enzyme secretion in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol*, 16(4), 745-53.
- Shevchik, V. E., & Condemine, G. (1998). Functional characterization of the *Erwinia chrysanthemi* Outs protein, an element of a type II secretion system. *Microbiology*, 144(11), 3219-3228.
- Shevchik, V., & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1997). Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol Microbiol*, 24(6), 1285-301.
- Shevchik, V., Robert-Baudouy, J., & Condemine, G. (1997). Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of the general secretory pathway, and secreted proteins. *EMBO J*, 16(11), 3007-16.
- Shevchik, V., Scott, M., Mayans, O., & Jenkins, J. (1998). Crystallization and preliminary X-ray analysis of a member of a new family of pectate lyases, PelI from *Erwinia chrysanthemi*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 54(Pt 3), 419-22.
- Shin, J., Kim, M., & Ahn, T. (2006). Effects of signal peptide and adenylate on the oligomerization and membrane binding of soluble SecA. *J Biochem Mol Biol*, 39(3), 319-28.
- Shiue, S., Chien, I., Chan, N., Leu, W., & Hu, N. (2007). Mutation of a key residue in the type II secretion system ATPase uncouples ATP hydrolysis from protein translocation. *Mol Microbiol*, 65(2), 401-12.
- Shiue, S., Kao, K., Leu, W., Chen, L., Chan, N., & Hu, N. (2006). XpsE oligomerization triggered by ATP binding, not hydrolysis, leads to its association with XpsL. *EMBO J*, 25(7), 1426-35.
- Shneider, M.M., Buth, S. A., Ho, B. T., Basler, M., Mekalanos J. J. & Leiman P. G. (2013) PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the Type VI secretion system spike, *Nature* 500 (7462), 350–353.
- Shruthi, H., Babu, M. M., & Sankaran, K. (2010). TAT-pathway-dependent lipoproteins as a niche-based adaptation in prokaryotes. *J Mol Evol.*, 70(4), 359-70.
- Sijbrandi, R., Urbanus, M. L., ten Hagen-Jongman, C. M., Bernstein, H. D., Oudega, B., Otto, B. R., & Luirink, J. (2003). Signal Recognition Particle (SRP)-mediated Targeting and Sec-dependent

- Translocation of an Extracellular *Escherichia coli* Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4654-4659.
- Sikora, A. E., Zielke, R. A., Lawrence, D. A., Andrews, P. C., & Sandkvist, M. (2011). Proteomic Analysis of the *Vibrio cholerae* Type II Secretome Reveals New Proteins, Including Three Related Serine Proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 16555-16566.
- Silverman, J.M., Agnello, D.M., Zheng, H., Andrews, B.T., Li, M., Catalano, C.E., Gonen, T., & Mougous, J.D. (2013) Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of Type VI secretion substrates. *Mol. Cell* 51(5) 584–593.
- Songsiriritthigul, C., Pantoom, S., Aguda, A., Robinson, R., & Suginta, W. (2008). Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: implications for the catalytic mechanism. *J Struct Biol*, 162(3), 491-9.
- Sorg, J. A., Blaylock, B., & Schneewind, O. (2006). Secretion signal recognition by YscN, the *Yersinia* type III secretion ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), 16490-16495.
- Sorg, J. A., Miller, N. C., Marketon, M. M., & Schneewind, O. (2005). Rejection of impassable substrates by *Yersinia* type III secretion machines. *Journal of Bacteriology*, 187(20), 7090-7102.
- Sory, M. P., Boland, A., Lambermont, I., & Cornelis, G. R. (1995). Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 92(26), 11998-12002.
- Sotomayor-Perez, A. C., Ladant, D., & Chenal, A. (2011). Calcium-induced Folding of Intrinsically Disordered Repeat-in-Toxin (RTX) Motifs via Changes of Protein Charges and Oligomerization States. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 16997-17004.
- Spangler, B. D. (1992). Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 56(4), 622-647.
- Spreter, T., Yip, C., Sanowar, S., Andre, I., Kimbrough, T., Vuckovic, M., Strynadka, N. (2009). A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol*, 16(5), 468-76.
- Stanley, N. R., Findlay, K., Berks, B. C., & Palmer, T. (2001). *Escherichia coli* Strains Blocked in Tat-Dependent Protein Export Exhibit Pleiotropic Defects in the Cell Envelope. *Journal of Bacteriology*, 183(1), 139-144.
- Steen, J. A., Bannam, T. L., Teng, W. L., Devenish, R. J., & Rood, J. I. (2009). The Putative Coupling Protein TcpA Interacts with Other pCW3-Encoded Proteins To Form an Essential Part of the Conjugation Complex. *Journal of Bacteriology*, 191(9), 2926-2933.
- Stingl, K., Muller, S., Scheidgen-Kleyboldt, G., Clausen, M., & Maier, B. (2010). Composite system mediates two-step DNA uptake into *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 107(3), 1184-1189.
- Strom, M., & Lory, S. (1991). Amino acid substitutions in pilin of *Pseudomonas aeruginosa*. Effect on leader peptide cleavage, amino-terminal methylation, and pilus assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 266(3), 1656-1664.
- Strom, M., & Lory, S. (1993). Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu Rev Microbiol*, 47, 565-96.
- Strozen, T. G., Li, G., & Howard, S. P. (2012). YghG (GspS β) Is a Novel Pilot Protein Required for Localization of the GspS β Type II Secretion System Secretin of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 80(8), 2608-2622.
- Strozen, T. G., Stanley, H., Gu, Y., Boyd, J., Bagdasarian, M., Sandkvist, M., & Howard, S. P. (2011). Involvement of the GspAB Complex in Assembly of the Type II Secretion System Secretin of *Aeromonas* and *Vibrio* Species. *Journal of Bacteriology*, 193(9), 2322-2331.

- Suzuki, H., Nishiyama, K., & Tokuda, H. (1998). Coupled structure changes of SecA and SecG revealed by the synthetic lethality of the *secAcsR11* and delta *secG::kan* double mutant. *Mol Microbiol*, 29(1), 331-41.
- Tam, P. C. K., Maillard, A. P., Chan, K. K. Y., & Duong, F. (2005). Investigating the SecY plug movement at the SecYEG translocation channel. *The EMBO Journal*, 24(19), 3380-3388.
- Tarry, M. J., Schafer, E., Chen, S., Buchanan, G., Greene, N. P., Lea, S. M., ... Berks, B. C. (2009). Structural analysis of substrate binding by the TatBC component of the twin-arginine protein transport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 106(32), 13284-13289.
- Tato, I., Zunzunegui, S., de la Cruz, F., & Cabezon, E. (2005). TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23), 8156-8161.
- Tauschek, M., Gorrell, R. J., Strugnell, R. A., & Robins-Browne, R. M. (2002). Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 99(10), 7066-7071.
- Terradot, L., & Waksman, G. (2011). Architecture of the *Helicobacter pylori* Cag-type IV secretion system. *FEBS J*, 278(8), 1213-22.
- Thomas, J. D., Reeves, P. J., & Salmond, G. P. C. (1997). The general secretion pathway of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: analysis of the membrane topology of OutC and OutF. *Microbiology*, 143(3), 713-720.
- Thomas, L., Doan, C., Oliver, R., & Yoder, M. (2002). Structure of pectate lyase A: comparison to other isoforms. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58(Pt 6 Pt 2), 1008-15.
- Thomas, N. A., Ma, I., Prasad, M. E., & Rafuse C. (2012). Expanded roles for multicargo and class 1B effector chaperones in type III secretion. *J Bacteriol*. 194(15), 3767-73.
- Tosi, T., Nickerson, N., Mollica, L., Jensen, M., Blackledge, M., Baron, B., Dessen, A. (2011). Pilotin-secretin recognition in the type II secretion system of *Klebsiella oxytoca*. *Mol Microbiol*, 82(6), 1422-32.
- Tosi, T., Pflug, A., Discola, K. F., Neves, D., & Dessen, A. (2013). Structural basis of eukaryotic cell targeting by type III secretion system (T3SS) effectors. *Research in Microbiology*, 164(6), 605-619.
- Tottey, S., Waldron, K., Firbank, S., Reale, B., Bessant, C., Sato, K., Robinson, N. (2008). Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding. *Nature*, 455(7216), 1138-42.
- Trindade, M., Job, V., Contreras-Martel, C., Pelicic, V., & Dessen, A. (2008). Structure of a widely conserved type IV pilus biogenesis factor that affects the stability of secretin multimers. *J Mol Biol*, 378(5), 1031-9.
- Tsai, R., Leu, W., Chen, L., & Hu, N. (2002). A reversibly dissociable ternary complex formed by XpsL, XpsM and XpsN of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus. *Biochem J*, 367(Pt 3), 865-71.
- Tseng, T., Tyler, B., & Setubal, J. (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol*, 9 Suppl 1, S2.
- Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Nureki, O. (2011). Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature*, 474(7350), 235-8.
- Turner, L. R., Lara, J. C., Nunn, D. N., & Lory, S. (1993). Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 175(16), 4962-4969.
- Urban, A., Leipelt, M., Eggert, T., & Jaeger, K.-E. (2001). DsbA and DsbC Affect Extracellular Enzyme Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183(2), 587-596.
- Van den Berg, B. (2010). Crystal structure of a full-length autotransporter. *Journal of Molecular Biology*, 396(3), 627-633.

- Van den Berg, B., Clemons, W. M., Jr, Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., & Rapoport, T. A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, 427(6969), 36-44.
- Van der Meeren, R., Wen, Y., Van Gelder, P., Tommassen, J., Devreese, B., & Savvides, S. N. (2013). New Insights into the Assembly of Bacterial Secretins: STRUCTURAL STUDIES OF THE PERIPLASMIC DOMAIN OF XcpQ FROM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(2), 1214-1225.
- Van der Sluis, E., Nouwen, N., & Driessen, A. (2002). SecY-SecY and SecY-SecG contacts revealed by site-specific crosslinking. *FEBS Lett*, 527(1-3), 159-65.
- Vassilyev, D., Mori, H., Vassilyeva, M., Tsukazaki, T., Kimura, Y., Tahirov, T., & Ito, K. (2006). Crystal structure of the translocation ATPase SecA from *Thermus thermophilus* reveals a parallel, head-to-head dimer. *J Mol Biol*, 364(3), 248-58.
- Veenendaal, A., van der Does, C., & Driessen, A. (2004). The protein-conducting channel SecYEG. *Biochim Biophys Acta*, 1694(1-3), 81-95.
- Viarre, V., Cascales, E., Ball, G., Michel, G. P. F., Filloux, A., & Voulhoux, R. (2009). HxcQ liposecretin is self-piloted to the outer membrane by its N-terminal lipid anchor. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(49), 33815-33823.
- Vignon, G., Kohler, R., Larquet, E., Giroux, S., Prevost, M.-C., Roux, P., & Pugsley, A. P. (2003). Type IV-Like Pili Formed by the Type II Secretion: Specificity, Composition, Bundling, Polar Localization, and Surface Presentation of Peptides. *Journal of Bacteriology*, 185(11), 3416-3428.
- Vincent, C., & Vogel, J. (2006). The *Legionella pneumophila* IcmS-LvgA protein complex is important for Dot/Icm-dependent intracellular growth. *Mol Microbiol*, 61(3), 596-613.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M., Lazdunski, A., Wu, L., & Filloux, A. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J*, 20(23), 6735-41.
- Voulhoux, R., Bos, M. P., Geurtsen, J., Mols, M., & Tommassen, J. (2003). Role of a Highly Conserved Bacterial Protein in Outer Membrane Protein Assembly. *Science*, 299(5604), 262-265.
- Voulhoux, R., Lazdunski, A., & Filloux, A. (2001). Colicin A hybrids: a genetic tool for selection of type II secretion-proficient *Pseudomonas* strains. *EMBO Rep*, 2(1), 49-54.
- Voulhoux, R., Taupiac, M.-P., Czjzek, M., Beaumelle, B., & Filloux, A. (2000). Influence of Deletions within Domain II of Exotoxin A on Its Extracellular Secretion from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182(14), 4051-4058.
- Waksman, G., & Fronzes, R. (2010). Molecular architecture of bacterial type IV secretion systems. *Trends Biochem Sci*, 35(12), 691-8.
- Wallden, K., Williams, R., Yan, J., Lian, P. W., Wang, L., Thalassinou, K., Waksman, G. (2012). Structure of the VirB4 ATPase, alone and bound to the core complex of a type IV secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 109(28), 11348-11353.
- Wang, X., Pineau, C., Gu, S., Guschinskaya, N., Pickersgill, R. W., & Shevchik, V. E. (2012). Cysteine Scanning Mutagenesis and Disulfide Mapping Analysis of Arrangement of GspC and GspD Protomers within the Type 2 Secretion System. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19082-19093.
- Weatherspoon-Griffin, N., Zhao, G., Kong, W., Kong, Y., Morigen, Andrews-Polymenis, H., Shi, Y. (2011). The CpxR/CpxA Two-component System Up-regulates Two Tat-dependent Peptidoglycan Amidases to Confer Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 286(7), 5529-5539.
- Welch, R. (2001). RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. *Curr Top Microbiol Immunol*, 257, 85-111.
- Wilharm, G., Dittmann, S., Schmid, A., & Heesemann, J. (2007). On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 297(1), 27-36.

- Williams, S. L., & Schildbach, J. F. (2006). Examination of an inverted repeat within the F factor origin of transfer: context dependence of F TraI relaxase DNA specificity. *Nucleic Acids Research*, 34(2), 426-435.
- Wolff, N., Sapriel, G., Bodenreider, C., Chaffotte, A., & Delepelaire, P. (2003). Antifolding Activity of the SecB Chaperone Is Essential for Secretion of HasA, a Quickly Folding ABC Pathway Substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38247-38253.
- Wolfgang, M., van Putten, J., Hayes, S., Dorward, D., & Koomey, M. (2000). Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili. *EMBO J*, 19(23), 6408-18.
- Wong, K., & Buckley, J. (1991). Site-directed mutagenesis of a single tryptophan near the middle of the channel-forming toxin aerolysin inhibits its transfer across the outer membrane of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(22), 14451-14456.
- Wong, K. R., McLean, D. M., & Buckley, J. T. (1990). Cloned aerolysin of *Aeromonas hydrophila* is exported by a wild-type marine *Vibrio* strain but remains periplasmic in pleiotropic export mutants. *Journal of Bacteriology*, 172(1), 372-376.
- Worrall, L. J., Vuckovic, M., & Strynadka, N. C. J. (2010). Crystal structure of the C-terminal domain of the *Salmonella* type III secretion system export apparatus protein InvA. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 19(5), 1091-1096.
- Wowor, A., Yu, D., Kendall, D., & Cole, J. (2011). Energetics of SecA dimerization. *J Mol Biol*, 408(1), 87-98.
- Wu, K.-H., & Tai, P. C. (2004). Cys32 and His105 Are the Critical Residues for the Calcium-dependent Cysteine Proteolytic Activity of CvaB, an ATP-binding Cassette Transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 901-909.
- Xu, Z., Knafels, J., & Yoshino, K. (2000). Crystal structure of the bacterial protein export chaperone SecB. *Nat Struct Biol*, 7(12), 1172-7.
- Yahr, T., & Wickner, W. (2001). Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro. *EMBO J*, 20(10), 2472-9.
- Yamagata, A., Milgotina, E., Scanlon, K., Craig, L., Tainer, J., & Donnenberg, M. (2012). Structure of an essential type IV pilus biogenesis protein provides insights into pilus and type II secretion systems. *J Mol Biol*, 419(1-2), 110-24.
- Yamagata, A., & Tainer, J. (2007). Hexameric structures of the archaeal secretion ATPase GspE and implications for a universal secretion mechanism. *EMBO J*, 26(3), 878-90.
- Yanez, M., Korotkov, K., Abendroth, J., & Hol, W. (2008a). Structure of the minor pseudopilin EpsH from the Type 2 secretion system of *Vibrio cholerae*. *J Mol Biol*, 377(1), 91-103.
- Yanez, M., Korotkov, K., Abendroth, J., & Hol, W. (2008b). The crystal structure of a binary complex of two pseudopilins: EpsI and EpsJ from the type 2 secretion system of *Vibrio vulnificus*. *J Mol Biol*, 375(2), 471-86.
- Yeo, H.-J., Yuan, Q., Beck, M. R., Baron, C., & Waksman, G. (2003). Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 100(26), 15947-15952.
- Yip, C., Finlay, B., & Strynadka, N. (2005). Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone. *Nat Struct Mol Biol*, 12(1), 75-81.
- Yip, C., & Strynadka, N. (2006). New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem Sci*, 31(4), 223-30.
- Yoder, M. D., Lietzke, S. E., & Jornak, F. (1993). Unusual structural features in the parallel beta-helix in pectate lyases. *Structure (London, England: 1993)*, 1(4), 241-251.
- Yu, J., Webb, H., & Hirst, T. (1992). A homologue of the *Escherichia coli* DsbA protein involved in disulphide bond formation is required for enterotoxin biogenesis in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, 6(14), 1949-58.

- Zaitseva, J., Jenewein, S., Jumpertz, T., Holland, I. B., & Schmitt, L. (2005). H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *The EMBO Journal*, 24(11), 1901-1910.
- Zechner, E. L., Lang, S., & Schildbach, J. F. (2012). Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1592), 1073-1087.
- Zhang, F., Yin, Y., Arrowsmith, C., & Ling, V. (1995). Secretion and circular dichroism analysis of the C-terminal signal peptides of HlyA and LktA. *Biochemistry*, 34(13), 4193-201.
- Zhang, W., Rong, C., Chen, C., & Gao, G. (2012). Type-IVC Secretion System: A Novel Subclass of Type IV Secretion System (T4SS) Common Existing in Gram-Positive Genus *Streptococcus*. *PLoS One*, 7(10), e46390.
- Zhao, Z., Sagulenko, E., Ding, Z., & Christie, P. J. (2001). Activities of *virE1* and the VirE1 Secretion Chaperone in Export of the Multifunctional VirE2 Effector via an *Agrobacterium* Type IV Secretion Pathway. *Journal of Bacteriology*, 183(13), 3855-3865.
- Zheng, J., Ho, B., & Mekalanos, J. (2011). Genetic analysis of anti-amoebae and anti-bacterial activities of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*. *PLoS One*, 6(8), e23876.
- Zheng, J., & Leung, K. (2007). Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. *Mol Microbiol*, 66(5), 1192-206.
- Zhou, J., & Xu, Z. (2005). The structural view of bacterial translocation-specific chaperone SecB: implications for function. *Mol Microbiol*, 58(2), 349-57.
- Zhou, S., Yomano, L. P., Saleh, A. Z., Davis, F. C., Aldrich, H. C., & Ingram, L. O. (1999). Enhancement of Expression and Apparent Secretion of *Erwinia chrysanthemi* Endoglucanase (Encoded by *celZ*) in *Escherichia coli* B. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2439-2445.
- Zimmer, J., Li, W., & Rapoport, T. (2006). A novel dimer interface and conformational changes revealed by an X-ray structure of *B. subtilis* SecA. *J Mol Biol*, 364(3), 259-65.
- Zimmer, J., Nam, Y., & Rapoport, T. (2008). Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature*, 455(7215), 936-43.
- Zoufaly, S., Frobel, J., Rose, P., Flecken, T., Maurer, C., Moser, M., & Muller, M. (2012). Mapping Precursor-binding Site on TatC Subunit of Twin Arginine-specific Protein Translocase by Site-specific Photo Cross-linking. *Journal of Biological Chemistry*, 287(16), 13430-13441.

Summary

The type II secretion system (T2SS) transports folded proteins from the periplasm through the outer membrane into the milieu. In many pathogenic Gram-negative bacteria, the T2SS secretes various virulence factors in host tissue and is directly involved in pathogenesis. The phytopathogen *Dickeya dadantii* secretes a dozen of pectinases through a T2SS named Out. The secreted proteins are lacking an obvious common signal and secretion is thought to involve multiple transient interactions of folded exoproteins with several T2SS components. Molecular nature of these interactions remains unknown. To address this question we used an *in vivo* site-specific photo-crosslinking approach to capture such transient interactions within the functional T2SS of *D. dadantii*. In this technique, the photo-crosslinker para-benzoyl-L-phenylalanine, *p*Bpa, is introduced *in vivo* in place of a residue of interest and UV-irradiation of living cells provokes the formation of complexes between the protein of interest and its partners. First, in a systematic approach, *p*Bpa was introduced at several surface-exposed sites of the secreted protein PelI. This strategy permitted us to identify that one structural element, loop 3 of Fn3 domain in PelI, interacts both with the secretin, the outer membrane T2SS component, and with the PDZ domain of OutC, an inner membrane T2SS component. These results suggest that this loop 3 is a part of the secretion motif. The same approach permitted us to identify two other regions of PelI interacting with the T2SS: a linker situated between the two domains of PelI, which interacts with OutD, and an exposed region of the catalytic domain of PelI interacting with OutC.

In another approach, *p*Bpa was introduced into the T2SS components, OutC and OutD. These experiments suggested that the PDZ domain of OutC interacts with the secreted protein PelB. This study, in complement with other approaches, allowed us to uncover some important molecular features of the protein secretion by the T2SS.

Key words: The type II secretion system, PDZ domain, secretin, secretion motif, substrate recognition

Caractérisation moléculaire des signaux de sécrétion des protéines sécrétées par le système de sécrétion de type II de la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii*.

Résumé de la thèse :

Le système de sécrétion de type II (T2SS) assure le transport de protéines sous une forme repliée du périplasme dans le milieu extracellulaire. Ce système est largement exploité par les bactéries à Gram négatif pathogènes des plantes, des animaux et de l'homme où il permet la sécrétion de facteurs de virulence (des toxines et des enzymes lytiques). La bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii* utilise le T2SS appelé Out, pour sécréter une douzaine de pectinases qui dégradent les parois des cellules végétales. Les protéines sécrétées par le T2SS n'ont pas de motif de sécrétion apparent et leur sécrétion implique plusieurs interactions transitoires avec les composants du système. La nature moléculaire de ces interactions n'est pas connue. Afin de capter ces interactions transitoires lors du processus de sécrétion, j'ai utilisé le pontage dirigé *in vivo*. Cette technique repose sur l'incorporation d'un analogue photoréactif d'un acide aminé (le para-benzoyl-L-phénylalanine, *pBpa*) à la place des résidus soupçonnés de faire partie d'un site d'interaction. Le pontage est ensuite activé par une courte exposition des cellules aux UV ce qui permet la formation des complexes protéiques. Tout d'abord, cette technique a été utilisée pour introduire le *pBpa* dans plusieurs régions exposées à la surface d'une exoprotéine, PelI. Cette stratégie a permis de mettre en évidence qu'un élément structural, la boucle 3 du domaine Fn3 de PelI, est impliquée dans l'interaction avec la sécrétine OutD, le composant du T2SS situé dans la membrane externe, et avec le domaine PDZ d'OutC, un composant de la membrane interne. Ces résultats suggèrent que la boucle 3 fait partie d'un motif de sécrétion. Deux autres régions ont été identifiées au sein de PelI : le linker entre les deux domaines de PelI qui est impliqué dans l'interaction avec OutD et une région exposée du domaine catalytique qui interagit avec la protéine OutC.

La même approche a été utilisée pour introduire le *pBpa* dans les deux composants du T2SS, OutC et OutD. Ces expériences ont suggéré que le domaine PDZ d'OutC interagit avec une autre exoprotéine, PelB. Cette étude, de façon complémentaire à d'autres approches, nous a permis de démontrer certains détails moléculaires essentiels de la sécrétion par le T2SS.

Mots clés : Système de sécrétion de type II, domaine PDZ, sécrétine, motif de sécrétion, reconnaissance du substrat